



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Actividad antimicrobiana del extracto etanólico liofilizado de propóleo procedente de Ayacucho y Huaral frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Julio César AGURTO MENDIZÁBAL

Edilberto CUYA LÓPEZ

ASESOR

Robert Dante ALMONACID ROMÁN

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Agurto J, Cuya E. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico liofilizado de propóleo procedente de Ayacucho y Huaral frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2021.

Metadatos complementarios

Datos de autor 1	
Nombres y apellidos	EDILBERTO CUYA LÓPEZ
DNI	45129674
URL de ORCID	No aplica
Datos de autor 2	
Nombres y apellidos	JULIO CÉSAR AGURTO MENDIZÁBAL
DNI	71343655
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-5250-2120
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	ROBERT DANTE ALMONACID ROMAN
DNI	40493000
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4865-3820
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.1.1. Plantas medicinales con potencial farmacéutico y productos terapéuticos naturales (estudios fitoquímicos, estudios toxicológicos, estudios farmacológicos, procesos de industrialización).
Grupo de investigación	No aplica
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Laboratorio de Microbiología y Parasitología Básica y Aplicada País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Calle: Jr. Puno N°1002 Latitud: -12.05572 Longitud: -77.02324
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018 - 2019
URL de disciplinas OCDE	Farmacología, Farmacia https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

“Actividad antimicrobiana del extracto etanólico liofilizado de propóleo procedente de Ayacucho y Huaral frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*”

Que presentan los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

**JULIO CÉSAR AGURTO MENDIZÁBAL Y
EDILBERTO CUYA LOPEZ**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado Evaluador, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

SOBRESALIENTE (18 DIECIOCHO)

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

JURADO EVALUADOR (R.D. N.º 00105-FFB-D-2020)

- Dra. Mirtha Roque Alcarraz
- Dr. Américo Jorge Castro Luna
- Mg. Francisco Javier María Ramírez Cruz
- Mg. Oscar Herrera Calderon

Lima, 25 de marzo de 2021.

Dra. Mirtha Roque Alcarraz
Presidenta

INFORMACIÓN GENERAL	
Título del Proyecto	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO LIOFILIZADO DE PROPÓLEO PROCEDENTE DE AYACUCHO Y HUARAL FRENTE A <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Área de investigación (*)	Microbiología
Líneas de Investigación (*)	-
Ubicación geográfica donde se desarrolla la investigación (incluir localidades y/o coordenadas geográficas)	<ul style="list-style-type: none"> - Centro poblado lamblan, distrito de Ihuarí, provincia de Huaral, región Lima - Provincia de Huamanga y rio Pampas-huerto rio Blanco, región de Ayacucho
Institución que financia si corresponde	---
Año o rango de años que abarcó	2018 - 2019
DATOS DEL TESISISTA	
Apellidos y Nombres	Julio Cesar Agurto Mendizábal
Número de matrícula	09040047
Indicar si es egresado o si aún está cursando estudios, de ser así especificar el año de estudios	Egresado
Código ORCID (opcional)	-
Apellidos y Nombres	Edilberto Cuya López
Número de matrícula	09040059
Indicar si es egresado o si aún está cursando estudios, de ser así especificar el año de estudios	Egresado
Código ORCID (opcional)	-
DATOS DEL ASESOR I	
Apellidos y nombres	Almonacid Román Robert Dante
Código docente: 0A2040	Categoría: Auxiliar Clase: Tiempo completo
Máximo grado alcanzado	Bachiller en Farmacia y bioquímica
Código ORCID (obligatorio)	https://orcid.org/0000-0003-4865-3820
Título profesional	Químico Farmacéutico
Departamento Académico al que pertenece	Microbiología y Parasitología Básica y Aplicada
Instituto de Investigación al que pertenece	Instituto de Investigación en Química, Biología, Microbiología y Biotecnología "Marco Antonio Garrido Malo"
"Grupo de investigación al que pertenece indicar si es coordinador, miembro o adherente del grupo de investigación"	"INNOVACIÓN, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE PRODUCTOS FUNCIONALES (Miembro titular) / BIOFILMS BACTERIANOS EN EL PERÚ (miembro adherente)"

Julio Agurto

Dedico el presente trabajo a mi madre Carmen Mendizábal por su apoyo en mi desarrollo como profesional y como persona. A mi novia María Ivonne por su amor y confianza.

Edilberto Cuya

Dedico el presente trabajo a mi familia y amigos por su apoyo incondicional en mi desarrollo como profesional y como persona.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos un especial agradecimiento a nuestro asesor Q.F. Robert Dante Almonacid Román, por su orientación, vocación de enseñanza y apoyo que se vieron reflejados en todas las etapas del desarrollo de nuestra tesis.

A los profesores de la cátedra de microbiología por sus consejos y recomendaciones en la elaboración y ejecución del presente trabajo de tesis.

Al Sr Jhon Huaman de la empresa “Cataleya – Cantuta” por su apoyo desinteresado en el desarrollo del presente trabajo y por transmitir sus conocimientos y experiencias en apicultura, deseándole muchos éxitos y prosperidad

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE TABLAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii

Pág.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivo general	2
1.2 Objetivos específicos	2
1.3 Hipótesis	2
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Definición y origen.....	3
2.2 Composición química del propóleo	3
2.3 Propiedades antimicrobianas del propóleo.....	7
2.4 Resistencia Antimicrobiana	8
2.4.1 Mecanismos de resistencia	9
2.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.4.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
2.5 Obtención de extractos de propóleos por extracción etanólica.....	13
2.6 El propóleo y su recolección	14
2.6.1 Recolección técnica mediante mallas plásticas.....	14
2.6.2 Recolección artesanal por raspado	14
3. METODOLOGÍA	15
3.1 Obtención del extracto etanólico liofilizado.....	15
3.1.1 Procedimiento	15

	Pág.
3.2 Determinación de compuestos fenólicos y flavonoides totales	17
3.2.1 Procedimiento	17
3.3 Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico lío­filizado de propóleo sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	22
3.3.1 “Método de difusión en agar”	22
3.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria por el “método de microdilución colorimétrica”	23
3.4 Evaluación del daño a la membrana citoplasmática	26
3.4.1 Método de cuantificación de potasio asociada a lisis celular	26
4. RESULTADOS	39
4.1 Obtención del extracto etanólico liofilizado	39
4.2 Determinación de compuestos fenólicos y flavonoides totales	40
4.2.1 Análisis cualitativo	40
4.2.2 Análisis cuantitativo	41
4.3 Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico lío­filizado de propóleo sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	49
4.3.1 “Método de difusión en agar”	49
4.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria por el “método de microdilución colorimétrica”	52
4.4 Evaluación del daño a la membrana citoplasmática	57
4.4.1 Método de cuantificación de potasio asociada a lisis celular	57
5. DISCUSIÓN	65
6. CONCLUSIONES	69
7. RECOMENDACIONES	70
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
9. ANEXOS	76

RESUMEN

La finalidad de la presente tesis fue evaluar la “actividad antimicrobiana del extracto etanólico liofilizado de propóleo” procedente de Ayacucho y Huaral sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, en la parte metodológica se determinó los compuestos fenólicos y flavonoides totales mediante análisis cualitativo empleando las reacciones con cloruro férrico e hidróxido de sodio y reacciones con acetato de plomo y Shinoda, así mismo el análisis cuantitativo por los métodos de Folin-Ciocalteu y espectrofotométrico. La actividad antimicrobiana se determinó por medio de los métodos de “difusión en agar” y “microdilución colorimétrica”, además se empleó el método de espectrometría de absorción atómica a la llama a fin de cuantificar la concentración de potasio asociado a lisis celular. En el propóleo recolectado de Ayacucho la concentración de flavonoides totales fue de 85,97 mg EQ/g y la concentración de fenoles totales de 31,96 mg EAG/g, siendo superior a lo encontrado en el propóleo recolectado de Huaral con una concentración para flavonoides totales de 64,2 mg EQ/g y una concentración de fenoles totales de 17,25 mg EAG/g. Los propóleos recolectados de Ayacucho y Huaral presentan actividad antimicrobiana significativa catalogado como “buena actividad” y “moderada actividad” con CMI de 62,5 µg/mL y 125 µg/mL frente a “*Staphylococcus aureus*” ATCC 6538 y actividad antimicrobiana significativa catalogado como “débil actividad” con CMI de 500 µg/mL para ambas muestras de propóleo frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Las muestras con “buena actividad” y “moderada actividad” antimicrobiana fueron evaluadas mediante el método de cuantificación de potasio asociada a lisis celular determinándose que ambas muestras de propóleo generan un aumento de las concentraciones de potasio a medida que aumenta el tiempo de incubación de 0, 2, 4, 6 y 12 horas a 37°C y que en 12 horas de incubación a 37°C se obtiene un incremento de potasio del 15,11% para la solución muestra propóleo de Huaral y un 16,39% para la solución muestra propóleo de Ayacucho. Se concluye que ambas muestras presentan actividad antimicrobiana, sin embargo cabe mencionar que la muestra de Ayacucho presenta mayor actividad antimicrobiana en comparación a la muestra de Huaral.

Palabras clave: Propóleo, actividad antimicrobiana, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

ABSTARCT

The finality of this thesis was to evaluate the “antimicrobial activity of the lyophilized ethanolic extract of propolis” from Ayacucho and Huaral on the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, In the methodological part, total phenolic compounds and flavonoids were determined by qualitative analysis using reactions with ferric chloride and sodium hydroxide and reactions with lead acetate and Shinoda, as well as quantitative analysis by Folin-Ciocalteu and spectrophotometric methods. The antimicrobial activity was determined by means of “agar diffusion” and “colorimetric microdilution” methods, likewise the flame atomic absorption spectrometry method was used in order to quantify the potassium concentration associated with cell lysis.

In the propolis collected from Ayacucho, the concentration of total flavonoids was 85,97 mg EQ/g and the concentration of total phenols of 31,96 mg EAG / g, being higher than that found in propolis collected from Huaral with a concentration for total flavonoids of 64,2 mg EQ/g and a concentration of total phenols of 17,25 mg EAG/g. The propolis collected from Ayacucho and Huaral show significant antimicrobial activity cataloged as good activity and moderate activity with MIC of 62,5 µg/mL and 125 µg/mL against “*Staphylococcus aureus*” ATCC 6538 and significant antimicrobial activity cataloged as weak activity with MIC of 500 µg/mL for both propolis samples against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. The samples with good activity and moderate antimicrobial activity were evaluated by the method of quantification of potassium associated with cell lysis, determining that both propolis samples generate an increase in the concentrations of potassium as the incubation time increases from 0, 2, 4, 6 and 12 hours at 37 ° C and that in 12 hours of incubation at 37 ° C a potassium increase of 15,11% is obtained for the sample solution propolis from Huaral and 16.39% for the solution sample propolis from Ayacucho. It is concluded that both samples have antimicrobial activity, however it is worth mentioning that the Ayacucho sample has greater antimicrobial activity compared to the Huaral sample.

Keywords: Propolis, antimicrobial activity, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Diseño experimental para las condiciones óptimas de liofilización.	16
Tabla 2. Preparación de soluciones estándar de quercetina.	18
Tabla 3. Preparación de soluciones estándar de ácido gálico.	20
Tabla 4. Distribución de muestras en microplaca.	25
Tabla 5. Clasificación de la “actividad antimicrobiana” según el valor de CMI.	22
Tabla 6. Preparación de la solución muestra de propóleo Huaral y Ayacucho.	29
Tabla 7. Preparación de los blancos.	30
Tabla 8. Identificación de muestras blanco.	31
Tabla 9. Diferencias de respuesta instrumental de blancos.	31
Tabla 10. Esquema para evaluación de la veracidad como diferencia de la respuesta instrumental de blancos comparada con un valor referencial de cero.	33
Tabla 11. Características organolépticas del extracto etanólico liofilizado.	39
Tabla 12. Resultados análisis cualitativo.	40
Tabla 13. Niveles de concentración de soluciones estándar de quercetina para curva de calibración.	41
Tabla 14. Respuesta obtenida a cuatro niveles de concentración.	42
Tabla 15. Cálculo del factor de dilución por muestra.	43
Tabla 16. Cálculo de la concentración hallada en solución muestra.	44
Tabla 18. Niveles de concentración de soluciones estándar de ácido gálico para curva de calibración.	43
Tabla 19. Respuestas obtenidas a cinco niveles de concentración.	46
Tabla 20. Cálculo del factor de dilución por muestra.	47
Tabla 21. Cálculo de la concentración hallada en solución muestra.	48

	Pág.
Tabla 22. Concentración de fenoles totales en muestras de propóleo expresados como equivalente de ácido gálico.	48
Tabla 23. “Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos liofilizado de propóleo procedente de Ayacucho y procedente de Huaral mediante el método de difusión en agar”.	49
Tabla 24. Resultados de las lecturas de CMI de las muestras de propóleo sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.	55
Tabla 25. Resultados de las lecturas de CMI de las muestras de propóleo sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027.	56
Tabla 26. Niveles de concentración a partir de solución stock de potasio.	57
Tabla 27. Respuestas obtenidas a tres niveles de concentración.	57
Tabla 28. Respuesta instrumental de solución muestra propóleo procedente de Huaral.	59
Tabla 29. Respuesta instrumental de solución muestra propóleo procedente de Ayacucho.	59
Tabla 30. Respuesta instrumental obtenida en lectura de blanco.	61
Tabla 31. Diferencias de respuesta instrumental obtenida en lectura de blanco a evaluar en programa Minitab.	61

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Principales grupos de compuestos químicos que se encuentran presentes en el propóleo.	4
Figura 2. Flavonoides totales encontrados en propóleo.	5
Figura 3. Ácidos aromáticos presentes en propóleo.	6
Figura 4. Sustancias responsables de la fragancia característica de los propóleo.	6
Figura 5. Los mecanismos de la actividad del propóleo contra las bacterias.	8
Figura 6. Curva de calibración a cuatro niveles de concentración.	42
Figura 7. Fórmula para el cálculo del factor de dilución.	43
Figura 8. Curva de calibración a cinco niveles de concentración.	46
Figura 9. Fórmula para el cálculo del factor de dilución.	47
Figura 10. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos liofilizados de propóleo procedente de Huaral y Ayacucho a concentración de 10%, 20% y 30% por el “método de difusión en agar” contra “ <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538”.	50
Figura 11. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos liofilizados de propóleo procedente de Huaral y Ayacucho a concentración de 10%, 20% y 30% por el “método de difusión en agar” contra “ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027”.	51
Figura 12. Determinación de la CMI en muestras de propóleo sobre “ <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538” y “ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027”.	51
Figura 13. Repeticiones del ensayo de determinación de la CMI en muestras de propóleo sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027.	54
Figura 14. Comparativo CMI de las muestras de propóleo Huaral y propóleo Ayacucho sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.	55

	Pág.
Figura 15. Comparativo CMI de las muestras de propóleo Huaral y propóleo Ayacucho sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027.	56
Figura 16. Curva de calibración a tres niveles de concentración.	58
Figura 17. Tendencia de respuesta instrumental solución muestra propóleo Huaral y propóleo Ayacucho.	60
Figura 18. Evaluación de la normalidad de datos mediante estadístico Anderson-Darling.	62
Figura 19. Evaluación de la veracidad de datos mediante estadístico T-Student.	63
Figura 20. Valores individuales para diferencia de blancos en evaluación de la veracidad.	64

LISTA DE ABREVIATURAS

DMSO: Dimetilsulfóxido

CLSI: Clinical and Laboratory Standard Institute

TSA: Agar tripticasa de soya

CE: Control de esterilidad

CP: Control positivo

ATCC: American Type Culture Collection

CMI: Concentración mínima inhibitoria

EEP: Extracto etanólico de propóleo

GAE: Ácido gálico equivalente

BSA: Albúmina suero de bovino

FAAS: Espectrometría de absorción atómica a la llama

MTC: Medida de tendencia central

mg EQ: Miligramos equivalente de quercetina

mg EAG: Miligramos equivalente de ácido gálico

Ho: Hipótesis nula

Ha: Hipótesis alterna

SM: Solución madre

1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de autores a nivel nacional e internacional mencionan que el propóleo presenta actividad antimicrobiana frente a diversas bacterias, el cual varía en función al lugar de recolección de las muestras; los principales componentes activos asociados a la actividad antimicrobiana del propóleo son los compuestos fenólicos y flavonoides. En la actualidad la medicina natural es una de las alternativas más utilizadas por la población rural, sobre todo en países en vías de desarrollo, aunque países industrializados también experimentan el renacimiento del interés por la investigación de esta alternativa médica¹. El propóleo es una sustancia resinosa elaborada por las abejas melíferas (*Apis mellifera*) a partir de los brotes y exudados de ciertas plantas. Una vez colectado, el material es enriquecido con secreciones salivares y enzimáticas, y usado para construir y reparar la colmena. Sin embargo, el propóleo no solo es un material de construcción, sino que también es el “arma química” de las abejas contra los microorganismos patógenos, la presencia de esta sustancia al interior de la colmena proporciona un ambiente inadecuado para el crecimiento de bacterias y otros microorganismos². Es una sustancia que contiene gran variedad de compuestos químicos, siendo inestable al medio ambiente dependiendo de su origen vegetal. La composición del propóleo varía según su origen botánico, de la variedad de la abeja, de la época y de las técnicas de recolección³. El propóleo, es una sustancia resinosa natural constituida por resina (50%), cera (30%), aceites esenciales (10%), polen (5%) y otras sustancias (5%), posee efectos antimicrobiano, antiinflamatorio, antioxidante, antidiabético, espasmolítico, anestésico, anticancerígeno e inmunomodulador⁴. La actividad enzimática de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas sobre los sistemas biológicos, se ve reducida en presencia de propóleo³. La Organización Mundial de la Salud presenta una lista de patógenos prioritarios para la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos en la cual indica a Prioridad 1: Crítica a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* y Prioridad 2: Alta a la bacteria *Staphylococcus aureus*⁵. La presente tesis surge con la finalidad de responder a la necesidad de conocimiento a fin de enfrentar a patógenos prevalentes mediante la medicina natural de nuestro país, tal es así el propóleo, una resina natural con múltiples componentes químicos capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos.

1.1. Objetivo general

- Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico liofilizado de propóleo procedente de Ayacucho y Huaral sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

1.2. Objetivos específicos

- Determinar mediante análisis cualitativo los compuestos fenólicos y flavonoides totales, de igual manera mediante análisis cuantitativo a través de los métodos de Folin-Ciocalteu y espectrofotométrico en los extractos etanólicos liofilizados de propóleo.
- Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos liofilizado de propóleo frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 empleando los métodos de “difusión en agar” y “microdilución colorimétrica”.
- Evaluar el daño a la membrana citoplasmática de una suspensión de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, asociado a lisis celular causada por los extractos etanólicos liofilizado de propóleo.

1.3. Hipótesis

El extracto etanólico liofilizado de propóleo procedente de Ayacucho y de Huaral presenta actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Definición y origen

El propóleo es muy apreciado por sus propiedades medicinales para los humanos, especialmente en Europa del Este, América del Sur y Asia⁶. El propóleo (cola de abeja) es un material pegajoso de color oscuro que las abejas recolectan de las plantas vivas, mezclan con cera y usan en la construcción y adaptación de sus nidos. El término "propóleo" fue utilizado por los pobladores de la antigua Grecia: pro (para, frente a, por ejemplo, en la entrada) y polis (ciudad o comunidad); una sustancia que es para o en defensa de la ciudad o colmena⁷. El propóleo es una sustancia de consistencia resinosa que es producida por las abejas al combinar resinas de origen vegetal con cera, enzimas salivares propias de las abejas, entre otros, con el fin formar una barrera natural dentro de la colmena, para reducir la incidencia de infecciones¹.

2.2 Composición química del propóleo

La composición química del propóleo está estrechamente relacionada con las resinas y bálsamos de las fuentes vegetales utilizadas para producirlo. Junto con el progreso de la investigación, se han identificado más de 300 componentes químicos del propóleo. Los principales grupos de compuestos químicos que se encuentran presentes en el propóleo son los polifenoles (ácidos fenólicos, flavonoides) y terpenoides (Figura 1)⁸. La alta actividad medicinal y la efectividad terapéutica del propóleo han contribuido a su amplio uso en la práctica médica tradicional. Rara vez se usa el propóleo crudo, en comparación al extracto etanólico condensado de propóleo (EEP), obtenido por extracción con etanol al 70%, ya que la forma de extracto etanólico se usa con fines médicos, dietéticos y cosméticos⁹.

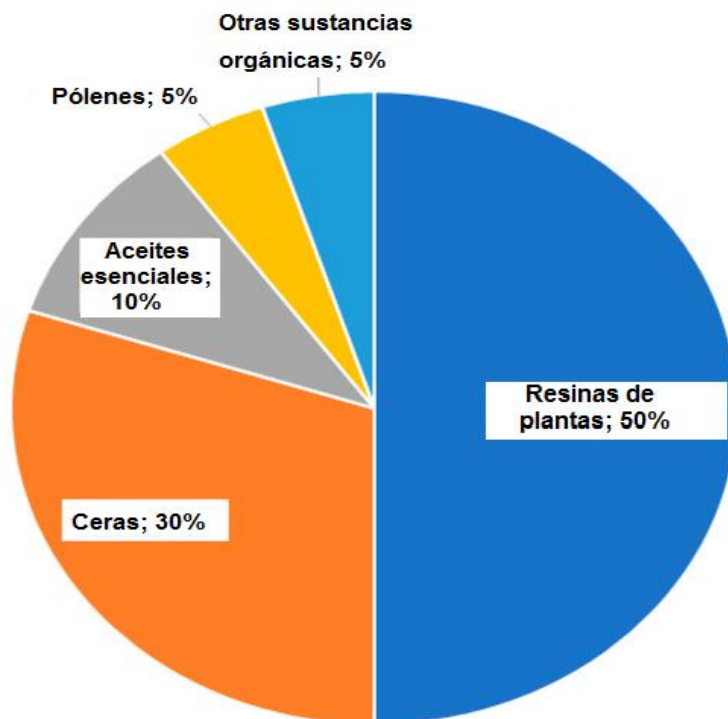
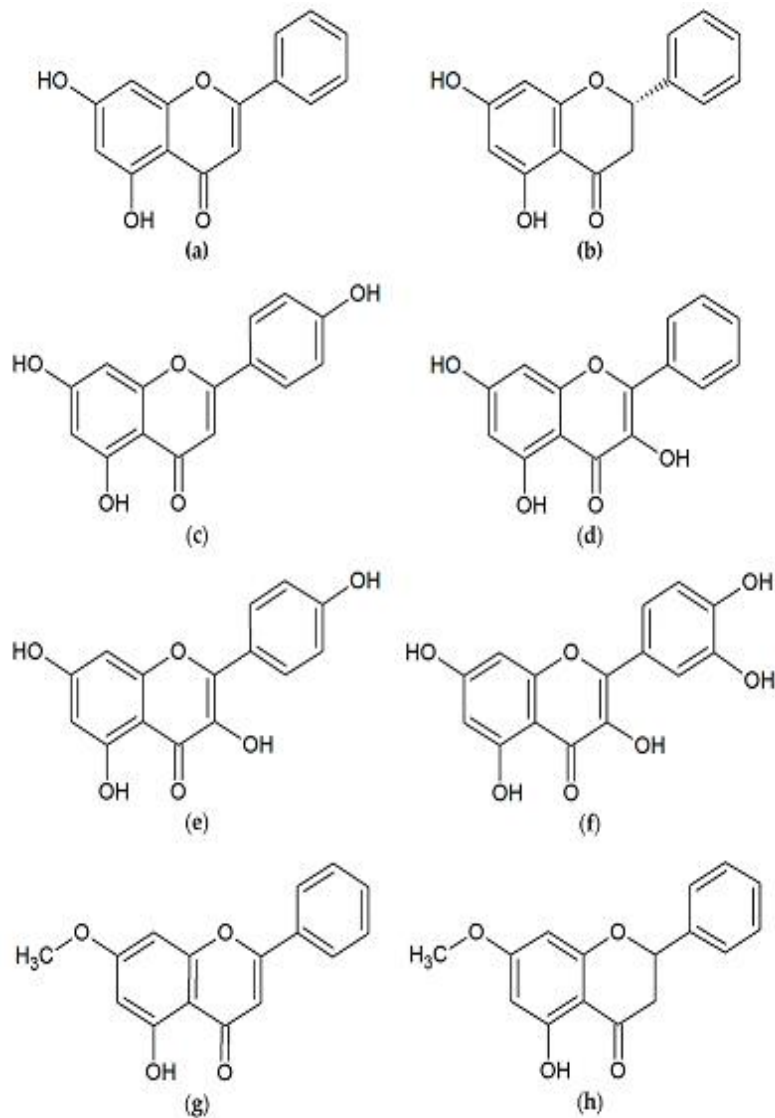


Figura 1. Principales grupos de compuestos químicos que se encuentran presentes en el propóleo

Fuente: Tomado de Przybylek y Col.

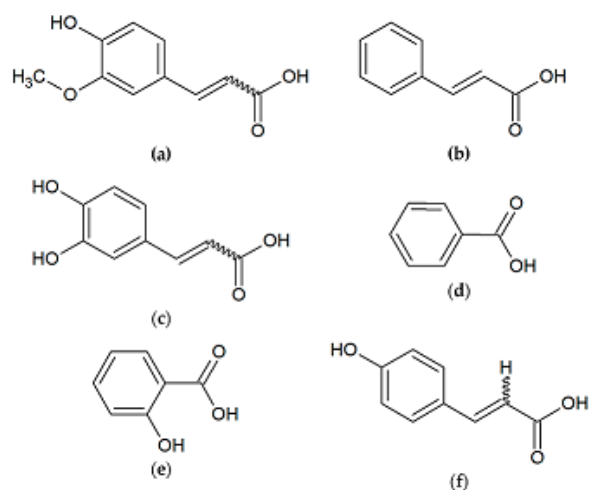
Los polifenoles y los terpenoides también se consideran los más activos. El grupo de flavonoides incluye crisina, pinocembrina, apigenina, galangina, kaempferol, quercetina, tectocrisina, pinostrobin y otros (Figura 2). Otro grupo crítico de compuestos químicos presentes en el propóleo son los ácidos aromáticos, entre los cuales se encuentran los ácidos ferúlico, cinámico, cafeico, benzoico, salicílico y p-cumarico (Figura 3). Además, el propóleo también incluye otros compuestos fenólicos (p. Ej., Artepilina C) y terpenos (terpineol, alcanfor, geraniol, nerol, farnesol) que son responsables de su fragancia característica. En el propóleo, se pueden encontrar microelementos y macroelementos (Mn, Fe, Si, Mg, Zn, Se, Ca, K, Na, Cu) y vitaminas B1, B2, B6, C y E. Esta diversidad de la composición química le da al propóleo una ventaja adicional como agente antimicrobiano. La combinación de muchos ingredientes activos y su presencia en diversas proporciones evita la aparición de resistencia bacteriana⁸.



(a)Crisina; (b)Pinocembrina; (c)Apigenina; (d)Galangina
(e)Kaempferol; (f)Quercetina; (g)Tectocrisina; (h)Pinostrombina

Figura 2. Flavonoides totales encontrados en propóleo

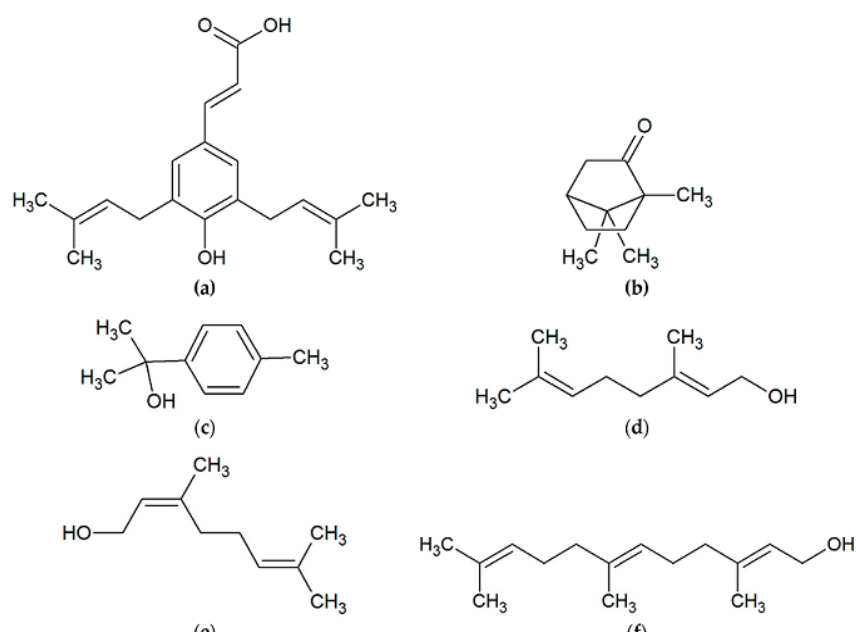
Fuente: Tomado de Przybylek y Col.



(a)Ácido ferulico; (b)Ácido cinámico; (c)Ácido cafeico;
(d)Ácido benzoico; (e)Ácido salicílico; (f)Ácido p-cumárico

Figura 3. Ácidos aromáticos presentes en propóleo

Fuente: Tomado de Przybylek y Col.



Sustancias responsables de la fragancia característica de los propóleos.
(a)Compuesto fenólico artepilina C; Terpenos : (b)Alcanfor; (c)Terpineol; (d) Geraniol; (e)Nerol;
(f)Farnesol

Figura 4. Sustancias responsables de la fragancia característica de los propóleos

Fuente: Tomado de Przybylek y Col.

2.3 Propiedades antimicrobianas del propóleo

Se informa que la actividad antimicrobiana del propóleo se debe a los flavonoides, ácidos aromáticos y sus ésteres. El mecanismo de esta actividad se atribuye a una sinergia entre compuestos fenólicos y otros compuestos en la resina¹⁰. La actividad antimicrobiana del propóleo debe considerarse en dos niveles. Primero, está relacionado con la acción directa sobre el microorganismo, y el otro con la estimulación del sistema inmune que resulta en la activación de las defensas naturales del organismo. El análisis de los mecanismos del propóleo le permite inferir su efecto sobre la permeabilidad de la membrana celular de los microorganismos, la interrupción del potencial de membrana y la producción de adenosina trifosfato (ATP), así como la disminución de la movilidad bacteriana (Figura 5). En general, se observa que la actividad antimicrobiana del propóleo es mayor en las bacterias Gram (+). Esto se explica por la estructura específica de la membrana externa de las bacterias Gram negativas y la producción de enzimas hidrolíticas que descomponen los ingredientes activos del propóleo⁸. La efectividad antimicrobiana de los extractos depende del solvente empleado, la procedencia del propóleo y de la especie bacteriana evaluada, siendo los extractos etanólicos (EEP) los más efectivos¹¹. Ensayos in vitro han demostrado que los extractos de propóleo son más eficaces frente a los cocos Gram (+) (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus β -haemolyticus*) y que solo actúan frente a algunas bacterias Gram (-) como *Escherichia coli* o *Pseudomonas aeruginosa*¹².

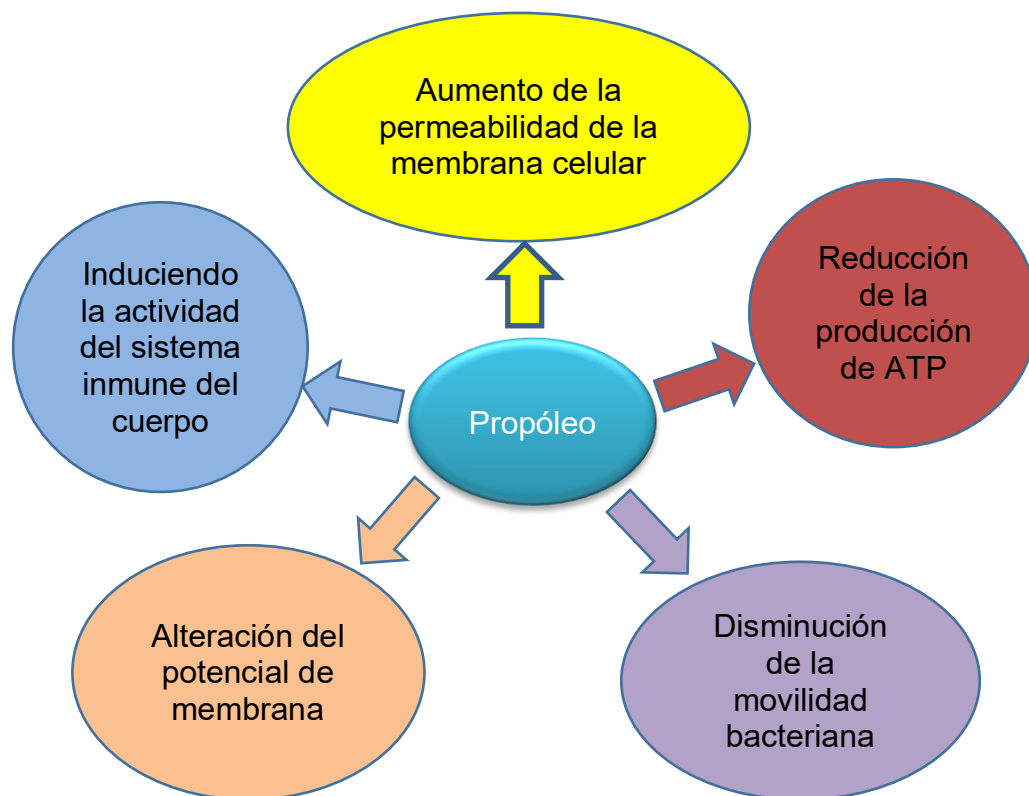


Figura 5. Los mecanismos de la actividad del propóleo contra las bacterias

Fuente: Tomado de Przybylek y Col.

2.4 Resistencia antibacteriana

La resistencia antibacteriana se define como la capacidad que adquieren las bacterias al sobrevivir a concentraciones de medicamentos que inhiben o destruyen ciertos microorganismos y otros de la misma especie; así mismo, está asociado con el uso excesivo e inadecuado de antibacterianos.

La resistencia a los antibacterianos es uno de los mayores retos que tendremos que afrontar, ya que se prevé que para el año 2050, 10 millones de personas en todo el mundo morirán con infecciones por microorganismos resistentes.

Debido a la resistencia a los antibacterianos, muchas infecciones bacterianas se han vuelto imposibles de tratar. El término "superbacterias" se refiere a microorganismos patógenos con mayor morbilidad y mortalidad, dotados de altos niveles de resistencia a las clases de antibacterianos específicamente recomendados para su tratamiento.

Las opciones terapéuticas se reducen y los períodos de atención hospitalaria son más largos y costosos. Estas bacterias, también son responsables de altas cargas económicas para los sistemas de salud que son conscientes del problema por ello están coordinando esfuerzos para hacer posible la gestión de la crisis instalada¹³.

2.4.1 Mecanismos de resistencia

La resistencia es un fenómeno ecológico que se produce como respuesta de las bacterias a la exposición constante a antibacterianos. Una mutación hace que las bacterias sean resistentes a esta sustancia tóxica, siendo una gran ventaja frente a los antibacterianos.

Los genes de resistencia evolucionaron mediante la acumulación de mutaciones que permiten sobrevivir en presencia de moléculas tóxicas. Los errores o mutaciones en la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) durante la división celular y la multiplicación bacteriana afectan negativamente al microorganismo, sin embargo en ocasiones la mutación tiene un efecto positivo en su supervivencia.

Teniendo esto en cuenta, no es sorprendente que para la mayoría de nuestros antibacterianos, que provienen de fuentes naturales (como las bacterias del suelo), ya existe un gen que podría ser responsable de los mecanismos de resistencia. A medida que las bacterias crecen, se multiplican rápidamente, experimentan mutaciones y pueden intercambiar material genético entre cepas de la misma o diferentes especies, la aparición de una población descendiente resistente es bastante rápida.

Son varios los mecanismos que pueden utilizar las bacterias y varían según la especie y el entorno donde se encuentren.

Las bacterias pueden producir sistemas de transporte, bombas de eflujo, que eliminan activamente las sustancias nocivas de la célula. Estas bombas son una estrategia de resistencia, sin embargo, no son específicas para antibacterianos, se utilizan para una gran cantidad de otras sustancias tóxicas.

Otro de los mecanismos de resistencia es la eliminación del efecto antibacteriano a través de una proteína capaz de destruir una parte esencial de la molécula del fármaco dejándola ineficaz. Las bacterias adquieren la capacidad de encontrar formas alternativas de realizar ciertas tareas celulares que dependían de la proteína

inhibida por el antibacteriano. Alcanzan este tipo de resistencias, produciendo proteínas redundantes, es decir, copias de seguridad, que cumplen las mismas funciones que la proteína inhibida. Esta estrategia de evasión se verifica, por ejemplo, en el caso de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), una de las “superbacterias”.

Las propias bacterias también pueden producir moléculas antibacterianas, ya que esta capacidad les permite sobrevivir matando otras bacterias u hongos que compiten por los mismos nutrientes.

¿Cómo han contribuido los seres humanos a la epidemia que enfrentamos?, el principal responsable es el uso excesivo y/o inadecuado de antibacterianos. La prescripción incorrecta de antibióticos tiene un beneficio terapéutico muy cuestionable y expone a los pacientes a posibles complicaciones, como toxicidad renal, toxicidad hepática, entre otras. Las concentraciones séricas subterapéuticas o por debajo de la concentración inhibitoria mínima (MIC) dan como resultado el desarrollo de resistencia a los antibacterianos.

Cuando los pacientes interrumpen el tratamiento con antibacterianos porque muestran signos de mejoría de la infección, tomando una dosis incompleta, aumenta la probabilidad de recaída del paciente, lo cual genera que la bacteria sea resistente al antibacteriano administrado anteriormente. Los antibacterianos también se usan en exceso en el ganado para tratar a los animales enfermos, sin embargo, se sabe que su uso aumenta el tamaño (y el valor) del ganado, lo que brinda a los agricultores aún más incentivos para el uso excesivo como promotores de crecimiento. También se utilizan en agricultura, en la fumigación de árboles frutales con pesticidas a base de tetraciclinas y estreptomicina. En ambas situaciones, el medio microbiano se ve afectado, ya que los antibacterianos al ser ingeridos por animales se excretan en la orina y las heces, que al transformarse en fertilizantes acaban dispersándose contaminando las aguas subterráneas y superficiales.

La comercialización de productos de higiene con antibacterianos también puede contribuir a agravar este problema, al inhibir el sistema inmunológico haciendo que los niños y adultos sean más vulnerables a las bacterias presentes en el ambiente. La vulnerabilidad del sistema inmunológico puede conducir a un aumento de la

morbilidad y la mortalidad debido a agentes que en condiciones normales no serían virulentos.

Las infecciones resistentes suelen detectarse mediante ensayo y error (tratamientos consecutivos ineficaces). Todos los métodos eficaces para determinar la sensibilidad bacteriana pueden mejorar en gran medida el tratamiento de infecciones y ayudar a contener posibles brotes de resistencia. Si bien la búsqueda de nuevos tratamientos para las infecciones resistentes a los antibacterianos permanece en las “agendas” de las empresas farmacéuticas y de las entidades de salud nacional e internacional, es imperativo ajustar el comportamiento y las actitudes humanas hacia el uso de antibacterianos.

En la actualidad, la “superbacteria” más conocida es el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) que, aunque no tiene la misma reputación histórica que *Mycobacterium tuberculosis*, es sin duda el más mediatizado. En los últimos años, este patógeno multirresistente se ha convertido en la principal causa de infección hospitalaria y, recientemente, MRSA ha sido transferido a la comunidad, mostrando características de transmisión y aumento de virulencia¹³.

2.4.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram-positiva que coloniza principalmente las narinas y se considera un patógeno humano que muestra una incidencia creciente en pacientes con hospitalización prolongada, sometidos a medicamentos intravenosos o en tratamiento con alimentación enteral o diálisis, en heridas quirúrgicas postoperatorias, en úlceras de decúbito o en catéteres permanentes¹⁴. Es un importante patógeno responsable de varias infecciones de inicio comunitario con niveles significativos de morbilidad y mortalidad¹⁵. Estos microorganismos colonizadores actúan como reservorios, causan infecciones endógenas y se pueden transmitir a otros pacientes¹⁶. Uno de los grupos de bacterias que ha desarrollado mecanismos de resistencia a una gran cantidad de antibióticos actualmente en uso para terapias humanas y animales son los estafilococos, particularmente *Staphylococcus aureus*. Son responsables de un amplio espectro de enfermedades difíciles de tratar, incluidas las infecciones de la piel y los ojos, enfermedades transmitidas por los alimentos, neumonía, meningitis, endocarditis y

osteomielitis. Alta patogenicidad de *S. aureus* se basa en la producción de una amplia gama de factores de virulencia que incluyen proteína A, coagulasa, colagenasa, hialuronidasa, hemolisinas, lipasas, diferentes toxinas, proteínas adhesivas y también proteínas que favorecen la formación de biopelículas. Estas bacterias son muy ubicuas en el medio ambiente. Además, colonizan aproximadamente el 30% de todos los humanos; por lo general, de forma asintomática, sin embargo, cualquier insuficiencia del sistema inmunitario del huésped presenta un riesgo que favorece el desarrollo de infección. Debido a la creciente frecuencia de aislamiento de las cepas estafilocócicas resistentes a los antibióticos utilizados actualmente, su alto potencial de virulencia y su presencia común en el medio ambiente, existe una necesidad urgente de buscar nuevos agentes y sistemas de terapia eficaces contra estas bacterias¹⁷.

2.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Es un patógeno oportunista con una capacidad particular de causar enfermedad en sujetos inmunocomprometidos. *Pseudomonas aeruginosa* es la bacteria Gram-negativa más común encontrada en infecciones nosocomiales donde se ha informado que los sistemas de agua contribuyen a la transmisión bacteriana¹⁸. Es un patógeno humano oportunista capaz de causar una amplia gama de infecciones agudas y crónicas potencialmente mortales, particularmente en pacientes con defensa inmune comprometida, induce una mayor permeabilidad de las células epiteliales intestinales y respiratorias permitiendo a exoproductos citotóxicos como la “exotoxina A” entrar en las células huésped para inhibir la síntesis de proteínas e inducir muerte celular, se conoce que el sistema “quorum sensing” (QS) media una respuesta al factor antimicrobiano LL-37 del huésped al aumentar la producción de piocianina, cianuro de hidrógeno, elastasa y ramnolípidos. La producción de ramnolípidos dependiente del sistema “quorum sensing” (QS) tiene un papel crucial en la neutralización del ataque de neutrófilos debido a su propiedad necrótica¹⁹.

Es intrínsecamente resistente a una amplia gama de antibióticos, debido a que presenta una variedad de mecanismos que favorecen su adaptación, supervivencia y resistencia a múltiples clases de antibióticos, tiene capacidad de

formar biopelículas, creando un nicho de bacterias para una intensa interacción y comunicación célula-célula, así como un depósito de sustancias metabólicas, nutrientes y energía para promover el crecimiento mientras protege a las células de condiciones desfavorables. Los exopolisacáridos Psl, Pel y alginato son polisacáridos que favorecen la formación de biopelículas facilitando la adhesión y captación de nutrientes, siendo los principales componentes de la matriz de las biopelículas y así mismo determina la arquitectura de la biopelícula, los exopolisacáridos participan en la adhesión de la superficie y juegan un papel importante en la resistencia a las respuestas inmunitarias y a los tratamientos con antibióticos. Se ha demostrado que varios exopolisacáridos exhiben diferentes propiedades fisicoquímicas y confiere una estrategia de supervivencia para aumentar la flexibilidad y estabilidad de las biopelículas en diversas condiciones¹⁹.

2.5 Obtención de extractos de propóleos por extracción etanólica

Considerando los diferentes tipos de procesos que se utilizan en todo el mundo para la obtención de extractos de propóleo, el etanol es el solvente de primera elección, especialmente por la afinidad de sus características químicas con la matriz. También se pueden utilizar otros disolventes como éter etílico, agua, metanol y cloroformo para la extracción de componentes específicos del propóleo.

Los compuestos activos como flavonoides, compuestos fenólicos y agentes antioxidantes se encuentran en bajas concentraciones y puede explicarse por el hecho de que componentes no deseados como cera, resinas y otras sustancias están presentes en altas concentraciones, los cuales pueden interferir con el potencial biológico de los extractos de propóleo.

El método de extracción de los compuestos activos del propóleo influye en las propiedades del extracto de propóleo obtenido, encontrándose que diferentes métodos de extracción empleados en una misma muestra de propóleo puede obtener extractos con propiedades diferentes, determinando que el rendimiento y selectividad de algunos compuestos se ve afectado directamente por el método de extracción.

La extracción etanólica permite eliminar cera y otros productos orgánicos en el proceso, lo cual demuestra que es el método más eficaz para la obtención de

extractos con alto contenido de compuestos antioxidantes, como compuestos fenólicos y flavonoides que están asociados con el potencial biológico del extracto de propóleo²⁰.

2.6 El propóleo y su recolección

El propóleo es recolectado básicamente por dos métodos, el raspado y el método por medio de mallas plásticas semirrígidas, aunque se conoce en la actualidad un sistema colector inteligente de propóleo. El procedimiento de las mallas es la técnica que nos permite una cosecha del propóleo con menor cantidad de impurezas, en la antípoda de esta técnica se encuentra el método de raspado que debido a su modo de ejecución, al momento del raspaje se incorporan en el propóleo restos de madera lo que sin duda afecta la ulterior estandarización del mismo²¹.

2.6.1 Recolección técnica mediante mallas plásticas

Se emplea una malla plástica o “tela mosquitera”, la cual debe ser colocado entre la última caja y la tapa de la colmena para que las abejas cubran poco a poco los agujeros con propóleo traído de los árboles o recogido de colmenas despobladas.

Una vez que los orificios de la malla sea propolizado por las abejas, se deberá retirar de la colmena y llevar a congelación por varias horas hasta verificar que el producto se vuelva quebradizo y se desprenda con facilidad, caso contrario el producto permanecerá blando y con una característica viscosa difícil de desprender²².

2.6.2 Recolección artesanal por raspado

Se obtiene mediante el raspado con espátula de aquellas zonas donde las abejas hayan depositado el propóleo de forma espontánea como los marcos o entre la tapa, no se recomienda el uso de cuchillo u otro material que pueda desprender astillas de madera con lo que se obtendría propóleos con mucha impureza, el propóleo debe recolectarse de la forma más higiénica posible para evitar contaminaciones²².

3. METODOLOGÍA

3.1 Obtención del extracto etanólico liofilizado

3.1.1 Procedimiento

Las muestras de propóleo se recolectaron el mes de setiembre, en el centro poblado de Lamblan, distrito de Ihuarí, provincia de Huaral, región Lima y de la provincia de Huamanga y río Pampas-huerto río Blanco, región de Ayacucho durante un día. La recolección se realizó mediante el método de raspado.

Las muestras recolectadas fueron acondicionadas en envases protegidos de la luz y transportadas hasta el “Laboratorio de Microbiología Facultad de Farmacia y Bioquímica – UNMSM”

3.1.1.1 Preparación de extractos etanólicos

Se utilizó alcohol etílico 96° como solvente a fin de extraer la mayor cantidad de los componentes biológicamente activos²³.

Obtenido el propóleo libre de impurezas se prepararon los extractos etanólicos de propóleo (EEP) al 30% en etanol, para lo cual se pesó 75 g de propóleo y se llevó a un peso total de 250 g con etanol de 96°.

Posteriormente se colocó esta mezcla en un frasco de vidrio color ámbar durante 15 días y se procedió a filtrar la solución de propóleo^{24,25}.

Finalmente se colocó los extractos etanólicos en estufa a 40°C hasta obtener un peso constante a fin de concentrar la muestra antes de ser sometido al proceso de liofilización, esta muestra obtenida fue mantenida en conservación a una temperatura entre 2-8°C^{24,26}.

3.1.1.2 Liofilización de extractos etanólicos

La liofilización fue realizada mediante las etapas de congelación, secado primario y secundario, en la primera etapa, la congelación se llevó a cabo teniendo en cuenta la temperatura eutéctica del extracto etanólico de propóleo a fin de llevarlo a un estado amorfo sin romper la estructura; ya que el tiempo y la temperatura de congelación del extracto etanólico está en función de los solutos presentes en la solución obteniendo de esta manera cristales de hielo pequeños²⁷.

La segunda etapa, correspondiente al secado primario, se realizó a presión de vacío, permitiendo de esta manera la sublimación del hielo al suministrar la energía correspondiente al calor latente²⁸ (transferencia de energía por radiación o conducción a través del producto congelado).

Finalmente la tercera etapa correspondiente al secado secundario comienza cuando ha sido agotado el hielo en el producto y la humedad proviene del agua parcialmente ligada en el material es eliminado a través de los poros del producto que se está secando²⁹.

Tabla 1. Diseño experimental para las condiciones óptimas de liofilización

Etapa		Variación (C°/min)	Temperatura(°C)	Tiempo(Horas)
Congelación	1	-	-80	3
-	-	Desciende(C°/min)	Hold(°C)	-
Secado primario	2	0,2	-55	0,6
	3	0,6	-25	5
-	-	Asciende(C°/min)	Hold(C°)	Tiempo(Horas)
Secado secundario	4	0,5	0	3
	5	0,6	10	0,5
	6	1	24	-

En la tabla 1 se puede observar las etapas en los que consiste el proceso de liofilización. Previo a la temperatura a mantener (Hold) durante un tiempo determinado, la temperatura descenderá y ascenderá según la tasa indicada.

3.2 Determinación de compuestos fenólicos y flavonoides totales

3.2.1 Procedimiento

3.2.1.1 Análisis cualitativo

- Identificación de compuestos fenólicos³⁰.
 - a) Reacción con hidróxido de sodio: Se incorporó 1 mL de extracto en un tubo de prueba, luego se agregó 1 mL de hidróxido de sodio al 20%. Solución color naranja pardo es indicativo de compuestos fenólicos.
 - b) Reacción con Cloruro Férrico: Se incorporó 1 mL de extracto en un tubo de prueba, luego se agregó 0,5 mL (10 gotas) de cloruro férrico al 5%. Solución color naranja, verde o pardo oscuro es indicativo de compuestos fenólicos.
- Identificación de flavonoides totales³¹.
 - a) Reacción con acetato de plomo: En un tubo de prueba se agregó 2,5 mL de extracto, se adicionará 7 mL de etanol al 95% y 0,5 mL de acetato de plomo al 10%. Se agitó y dejó en reposo por 24 horas. Pasado ese tiempo se observará presencia de precipitado.
 - b) Reacción de Shinoda: En un tubo de prueba se agregó 2 mL de extracto, se adicionó granallas de magnesio metálico y 0,3 mL de ácido clorhídrico concentrado, se dejó reposar por 10 minutos. Coloración de rojo, naranja a violeta es indicativo de flavonoides.

3.2.1.2 Análisis cuantitativo

3.2.1.2.1 Cuantificación de flavonoides totales

a) Preparación de soluciones estándar

Se preparó cuatro niveles de concentración a partir de una solución madre de quercetina a 700 µg/mL para construir una curva de calibración.

▪ Preparación de solución madre (700 µg/mL)

Se pesó 7 mg de quercetina, fue llevada a fiola de 10 mL y se enrasó con etanol 96°.

▪ Preparación de soluciones estándar

Se tomaron alícuotas de 200 µL, 350 µL, 140 µL y 280 µL a partir de la solución madre y fueron llevadas a fiolas de 50 mL, 50 mL, 10 mL y 10 mL respectivamente en los cuales se adicionó:

200 µL de acetato de sodio 1 M y 200 µL nitrato de aluminio 10% a las fiolas de volumen 10 mL y 1000 µL de acetato de sodio 1 M, 1000 µL nitrato de aluminio 10% a las fiolas de volumen 50 mL para finalmente ser enrasados con etanol 96° y obtener cuatro niveles de concentración a 2,8 µg/mL; 4,9 µg/mL; 9,8 µg/mL y 19,6 µg/mL de quercetina (Tabla 2).

Tabla 2. Preparación de soluciones estándar de quercetina

Solución madre	Alícuota (volumen en µL)	Acetato de sodio 1M (volumen en µL)	Nitrato de aluminio 10% (volumen en µL)	Volumen de dilución (mL)	Concentración Final (µg/mL)
700 (µg/mL)	200	1000	1000	50	2,8
	350	1000	1000	50	4,9
	140	200	200	10	9,8
	280	200	200	10	19,6

b) Preparación del blanco

En una fiola de 10 mL se agregó 200 μ L de acetato de sodio 1 M y 0,200 mL nitrato de aluminio 10%, para posteriormente ser enrasado a volumen con etanol 96°.

c) Preparación de muestras

Se realizaron diluciones sucesivas a partir del peso de las muestras de la siguiente manera:

Dilución 1: Se pesó 0,5 g de muestra y se enrasó en una fiola de 25 mL con etanol 96°.

Dilución 2: Se tomó 10 mL de la dilución 1 y se lleva hasta el aforo con etanol 96° en fiola de 100 mL.

Dilución 3: Se tomó 0,5 mL de la dilución 2, se agregó 200 μ L de acetato de sodio 1 M, 200 μ L nitrato de aluminio 10% y se enrasó finalmente con etanol 96°.

d) Lectura de resultados

Las lecturas de muestras y soluciones estándares se realizaron a λ "longitud de onda" de 415 nm en el espectrofotómetro UV-Visible³².

3.2.1.2.2 Cuantificación de fenoles totales

a) Preparación de soluciones estándar

Se preparó cinco niveles de concentración según lo indicado en la Tabla 3.

- **Preparación de solución madre (100 µg/mL)**

Se pesó 10 mg de ácido gálico, fue llevada a fiola de 100 mL y se enrasó con etanol 96°.

- **Preparación de soluciones estándar**

Se tomaron alícuotas de 100 µL; 200 µL; 300 µL; 400 µL y 500 µL a partir de la solución madre y fueron llevadas a fiolas de 10 mL en los cuales se adicionó a cada fiola:

1,25 mL de reactivo Folin-Ciocalteu y 6,25 mL de solución carbonato de sodio al 20%, se sonicó por 5 minutos para finalmente ser enrasados con etanol 96° y obtener cinco niveles de concentración a 1 µg/mL; 2 µg/mL; 3 µg/mL; 4 µg/mL y 5 µg/mL de ácido gálico (Tabla 3).

Estas soluciones estándar fueron dejadas en reposo durante 2 horas protegidas de la luz antes de ser analizado.

Tabla 3. Preparación de soluciones estándar de ácido gálico

Solución madre	Alícuota (volumen en µL)	Reactivo Folin-Ciocalteu (volumen en mL)	Carbonato de sodio 20% (volumen en mL)	Volumen de dilución (mL)	Concentración Final (µg/mL)
100 (µg/mL)	100	1,25	6,25	10	1
	200	1,25	6,25	10	2
	300	1,25	6,25	10	3
	400	1,25	6,25	10	4
	500	1,25	6,25	10	5

a) Preparación del blanco

En una fiola de 10 mL se agregó 1,25 mL de reactivo Folin-Ciocalteu y 6,25 mL de solución carbonato de sodio al 20%, se sonicó por 5 minutos para finalmente ser enrasados con etanol 96°.

b) Preparación de muestras

Se realizaron diluciones sucesivas a partir del peso de las muestras de la siguiente manera:

Dilución 1: Se pesó 0,5 g de muestra y se llevó hasta el aforo con etanol 96° en fiola de 25 mL.

Dilución 2: Se tomó 1 mL de la dilución 1 y se enrasó en una fiola de 50 mL con etanol 96°

Dilución 3: Se tomó 2,5 mL de la dilución 2, se agregó 1,25 mL de reactivo Folin-Ciocalteu y 6,25 mL de solución carbonato de sodio al 20% se sonicó por 5 minutos y se enrasó finalmente con etanol 96°.

c) Lectura de resultados

Las lecturas de muestras y soluciones estándares se realizaron a λ "longitud de onda" de 760 nm en el espectrofotómetro UV-Visible³².

3.3 “Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico liofilizado de propóleo sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027”

3.3.1 Método de “difusión en agar”

Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento bacteriano mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido, evidenciándose en forma de halos claros sin crecimiento bacteriano.

3.3.1.1 Procedimiento

a) Bacterias utilizadas

Staphylococcus aureus ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

b) Elaboración de la suspensión del inóculo

Se sembraron bacterias crecidas en agar Manitol Salado por 48 horas para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y en agar Cetrimide por 48 horas para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Los microorganismos fueron preparados en suero fisiológico a concentración de $1,5 \times 10^8$ ufc/mL “escala 0,5 McFarland” para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

c) Preparación e inoculación en placas Petri estériles

Se adicionó 1 mL de inóculo “equivalente al tubo 0,5 en la escala de McFarland” por cada 100 mL de agar Mueller Hinton el cual fue homogenizado y distribuido en placas petri de vidrio estériles de 90 mm de diámetro, a razón de 25 mL por placa.

d) Incorporación de muestras e incubación

Se incorporó 0,1 mL de cada uno de los extractos en los orificios de las placas petri, los cuales se dejaron en reposo durante 1 hora a condiciones ambientales y se incubó a 37°C durante 24 horas para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

e) Lectura e interpretación de los resultados

Se midió los diámetros en milímetros de los “halos de inhibición (zonas claras de inhibición del crecimiento)”, evaluando que halos mayores a 18 mm son considerados como actividad antibacteriana significativa³³⁻³⁵.

Los extractos con actividad significativa fueron evaluados mediante el “método de microdilución” en placa para determinar su CMI “concentración mínima inhibitoria”.

3.3.2 “Determinación de la concentración mínima inhibitoria por el método de microdilución colorimétrica”

Método cuantitativo para determinar la menor concentración de las sustancias en evaluación que es capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias en estudio, siguiendo el protocolo CLSI M07-A09 modificado³⁵ del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI).

3.3.2.1 Procedimiento

a) Preparación de resazurina 20 mg/mL

Se pesó 200 mg de resazurina los cuales se disolvieron con agua estéril hasta obtener un volumen final de 10 mL, la solución obtenida fue filtrado por membrana de nylon 0,2 µm.

b) Preparación del control de esterilidad

Se utilizó como control de esterilidad el caldo Mueller Hinton con resazurina, con una proporción de “0,1 mL de solución de resazurina 20 mg/mL por cada 20 mL de caldo Mueller Hinton”^{36,37}.

c) Preparación de la muestra

Se disolvió el extracto seco de propóleo en DMSO y caldo Mueller Hinton a diluciones doblemente seriadas adaptado al protocolo CLSI M07-A09²² “esquema de diluciones de drogas insolubles en agua”. Se obtuvo 10 diluciones “doblemente concentradas” en el intervalo de 3,9 µg/mL – 2000 µg/mL de ambos extractos de propóleo.

d) Preparación del inóculo

Como paso previo a la prueba de microdilución, se realizó un repique de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 24 horas antes de la prueba de microdilución en agar TSA, para poder conseguir un mayor número de células viables. El día del ensayo, los microorganismos fueron preparados en suero fisiológico a concentración de $1,5 \times 10^8$ ufc/mL “escala 0,5 McFarland”. Se realizó una doble dilución de “1:30” y de “1:5” empleando caldo Mueller Hinton obteniendo un inóculo final de 1×10^6 ufc/mL³⁵.

“Posterior a la dilución del inóculo, se procedió de tal manera que por cada 20 mL de inóculo diluido se agregó 0,1 mL de resazurina 20 mg/mL”³⁶.

e) Procedimiento de la “prueba de microdilución colorimétrica”

Se realizó en “microplacas de 96 pocillos estériles con fondo en U”³⁷. (ver Tabla 4).

Tabla 4. Distribución de muestras en microplaca

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	E "Control de esterilidad"	X "Dilución doblemente seriada"	X/2 "Dilución doblemente seriada"	X/4 "Dilución doblemente seriada"	X/8 "Dilución doblemente seriada"	X/16 "Dilución doblemente seriada"	X/32 "Dilución doblemente seriada"	X/64 "Dilución doblemente seriada"	X/128 "Dilución doblemente seriada"	X/256 "Dilución doblemente seriada"	X/512 "Dilución doblemente seriada"	P "Control positivo"	S.a	Propoleo Huaral
B													S.a	
C													P.a	
D													P.a	
E													S.a	Propoleo Ayacucho
F													S.a	
G													P.a	
H													P.a	

Leyenda:

E: "Control de esterilidad"

P: "Control positivo"

P.a: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

S.a: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

La microplaca de 96 pocillos consta de 8 filas y 12 columnas distribuidas de la siguiente manera:

Columna 1: 200 µL de "control de esterilidad"

Columna 2 a la Columna 11: 100 µL de las diluciones doblemente concentradas de las muestras de propóleo y 100 µL de inóculo de cada microorganismo con el indicador resazurina

Columna 12: 200 µL de inóculo (control positivo)

Las muestras fueron incubadas a una temperatura de 37°C por un periodo de 24 horas a condiciones aeróbicas.

f) Lectura de resultados

El cambio de coloración de púrpura a rosado fue considerado como positivo y la menor concentración en la que no se produce cambio de color, se consideró como el valor de la CMI^{36,37}.

g) Interpretación de resultados

Se consideró como actividad antimicrobiana significativa los valores de CMI \leq 1000 $\mu\text{g/mL}$ según los parámetros de Paredes³⁸ y Holetz³⁹

Tabla 5. Clasificación de la “actividad antimicrobiana” según el valor de CMI

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
"Débil actividad"	500 a 1000
"Moderada actividad"	100 a <500
"Buena actividad"	<100

3.4 Evaluación del daño a la membrana citoplasmática

3.4.1 Método de cuantificación de potasio asociada a lisis celular

El ensayo se basa en la cuantificación espectrométrica de potasio presente en el sobrenadante obtenido a tiempo 0, 2, 4, 6 y 12 horas luego de incubar el inóculo bacteriano, suero albúmina de bovino y la muestra problema de extracto etanólico liofilizado de propóleo.

3.4.1.1 Preparación de materiales

3.4.1.1.1 Preparación de suero albúmina de bovino 0,625 P/V

Se pesó 0,625 g de suero albúmina de bovino (BSA), se adicionó en una fiola de 100 mL para posteriormente ser aforado a volumen con agua destilada.

3.4.1.1.2 Preparación de solución estabilizadora de cloruro de cesio

Se pesó 3,167 g de cloruro de cesio, se adicionó a una fiola con capacidad de 100 mL, se disolvió con 50 mL de agua destilada, se agregó 25 mL de ácido clorhídrico para posteriormente ser aforado a volumen con agua destilada.

3.4.1.1.3 Preparación de inóculo bacteriano

La bacteria empleada fue *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 la cual fue suspendida en suero fisiológico. Se ajustó a la escala 0,5 McFarland “equivalente a una concentración aproximada de $1 - 1,5 \times 10^8$ UFC/mL”.

3.4.1.2 Procedimiento para preparación de solución muestra de propóleo Huaral, solución muestra de propóleo Ayacucho y blanco

3.4.1.2.1 Preparación de muestra problema en DMSO (200 mg/mL)

Se pesó 20 mg de extracto etanólico liofilizado de propóleo y se disolvió con 100 µL de DMSO.

3.4.1.2.2 Preparación de solución muestra de propóleo Huaral

En un recipiente de polipropileno, se agregó 15 mL de BSA 0,625% P/V, luego 15 mL de inóculo a escala 0,5 McFarland y por último 50 µL de la muestra problema de propóleo Huaral.

3.4.1.2.3 Preparación de solución muestra de propóleo Ayacucho

En un recipiente de polipropileno, se agregó 15 mL de BSA 0,625% P/V, luego 15 mL de inóculo a escala 0,5 McFarland y por último 50 µL de la muestra problema de propóleo Ayacucho.

3.4.1.2.4 Preparación de blanco

En un recipiente de polipropileno, se agregó 15 mL de BSA 0,625% P/V, luego 15 mL de inóculo escala 0,5 McFarland y por último 50 µL de DMSO.

3.4.1.2.5 Obtención de sobrenadante

El blanco y las soluciones muestra fueron incubados a 37 °C. Se tomó 3 mL del Blanco y las muestras problema por separado, a tiempo: 0, 2, 4, 6, 12 horas, los cuales fueron centrifugados a 4000 RPM por 5 minutos. Se tomó 1 mL del sobrenadante y se trasvasó a tubos de polipropileno, los cuales fueron almacenados a -20°C⁴⁰.

3.4.1.2.6 Lectura de muestras

Antes de la lectura en el espectrómetro a la llama, se adicionó a cada tubo de polipropileno que contiene 1 mL del sobrenadante, 160 µL de solución estabilizadora de cloruro de cesio y se aforó a 10 mL con agua destilada.

Tabla 6. Preparación de la solución muestra de propóleo Huaral y Ayacucho

MUESTRA	PREPARACIÓN DE MUESTRA PROBLEMA EN DMSO 200 mg/mL		PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN MUESTRA DE PROPÓLEO			TIEMPO DE INCUBACIÓN A 37°C	OBTENCIÓN DE SOBRENADANTE (Centrifugación a 4000RPM X 5min)	ADICIÓN DE SOLUCION ESTABILIZADORA DE CLORURO DE CESIO		
	Peso de muestra	Dilución 1 (µL)	Alícuota 1 (µL)	BSA 0,625% (mL)	Inóculo bacteriano 0,5 Mc Farland (mL)		Alícuota 2 (mL)	Sobrenadante (mL)	Sol. Estabilizadora (µL)	Aforo final con agua destilada (mL)
Propóleo Huaral	20 mg	100	50	15	15	T0= 0 Horas	3	1	160	10
						T1= 2 Horas	3	1	160	10
						T2= 4 Horas	3	1	160	10
						T3= 6 Horas	3	1	160	10
						T4= 12Horas	3	1	160	10
Propóleo Ayacucho	20 mg	100	50	15	15	T0= 0 Horas	3	1	160	10
						T1= 2 Horas	3	1	160	10
						T2= 4 Horas	3	1	160	10
						T3= 6 Horas	3	1	160	10
						T4= 12Horas	3	1	160	10

Tabla 7. Preparación de los blancos

MUESTRA	PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN BLANCO			TIEMPO DE INCUBACIÓN A 37°C	OBTENCIÓN DE SOBRENADANTE (Centrifugación a 4000RPM X 5min)	ADICIÓN DE SOLUCION ESTABILIZADORA DE CLORURO DE CESIO		
	DMSO	BSA 0,625%	Inóculo bacteriano 0,5 Mc Farland		Alicuota (mL)	Sobrenadante (mL)	Sol. Estabilizadora (µL)	Aforo final con agua destilada (mL)
Blanco	50 µL	15 mL	15 mL	T0= 0 Horas	3	1	160	10
				T1= 2 Horas	3	1	160	10
				T2= 4 Horas	3	1	160	10
				T3= 6 Horas	3	1	160	10
				T4= 12Horas	3	1	160	10

3.4.1.3 Evaluación de respuesta instrumental de blancos

Para demostrar que la respuesta instrumental del blanco a tiempo 0, 2, 4, 6 y 12 Horas de incubación a 37°C es constante, no aporta variabilidad significativa en la cuantificación de potasio asociada a la lisis celular generada por las muestras de propóleo, se empleó el programa Minitab en el cual se evaluó las diferencias de los resultados obtenidos y se comparó a una media hipotética de cero (Valor referencial)

Tabla 8. Identificación de muestras blanco

MUESTRA	TIEMPO	IDENTIFICACIÓN DE BLANCOS
Blanco	T0= 0 Horas	T0 M1
		T0 M2
	T1= 2 Horas	T1 M1
		T1 M2
	T2= 4 Horas	T2 M1
		T2 M2
	T3= 6 Horas	T3 M1
		T3 M2
	T4= 12Horas	T4 M1
		T4 M2

Tabla 9. Diferencias de respuesta instrumental de blancos

N°	DIFERENCIAS DE BLANCOS	N°	DIFERENCIAS DE BLANCOS	N°	DIFERENCIAS DE BLANCOS	N°	DIFERENCIAS DE BLANCOS	N°	DIFERENCIAS DE BLANCOS
1	T0 M1 - T0 M2	11	T0 M2 - T1 M2	21	T1 M1 - T3 M1	31	T2 M1 - T2 M2	41	T3 M1 - T4 M1
2	T0 M1 - T1 M1	12	T0 M2 - T2 M1	22	T1 M1 - T3 M2	32	T2 M1 - T3 M1	42	T3 M1 - T4 M2
3	T0 M1 - T1 M2	13	T0 M2 - T2 M2	23	T1 M1 - T4 M1	33	T2 M1 - T3 M2	43	T3 M2 - T4 M1
4	T0 M1 - T2 M1	14	T0 M2 - T3 M1	24	T1 M1 - T4 M2	34	T2 M1 - T4 M1	44	T3 M2 - T4 M2
5	T0 M1 - T2 M2	15	T0 M2 - T3 M2	25	T1 M2 - T2 M1	35	T2 M1 - T4 M2	45	T4 M1 - T4 M2
6	T0 M1 - T3 M1	16	T0 M2 - T4 M1	26	T1 M2 - T2 M2	36	T2 M2 - T3 M1	--	--
7	T0 M1 - T3 M2	17	T0 M2 - T4 M2	27	T1 M2 - T3 M1	37	T2 M2 - T3 M2	--	--
8	T0 M1 - T4 M1	18	T1 M1 - T1 M2	28	T1 M2 - T3 M2	38	T2 M2 - T4 M1	--	--
9	T0 M1 - T4 M2	19	T1 M1 - T2 M1	29	T1 M2 - T4 M1	39	T2 M2 - T4 M2	--	--
10	T0 M2 - T1 M1	20	T1 M1 - T2 M2	30	T1 M2 - T4 M2	40	T3 M1 - T3 M2	--	--

3.4.1.3.1 Análisis estadístico

Los 45 datos producto de las diferencias instrumental de los blancos a tiempo 0, 2, 4, 6 y 12 Horas de incubación a 37°C son equivalentes a cero, para lo cual se evaluó los datos en el programa MINITAB mediante la secuencia descrita en la **Tabla 10**

Prueba de normalidad de datos

Prueba empleada para determinar cuál es la medida de tendencia central (MTC) que representa a la mayoría de los datos evaluados, en caso que los datos presenten una distribución normal, la MTC a emplear será el promedio o media poblacional y en caso que los datos no presenten una distribución normal, la MTC a emplear será la mediana

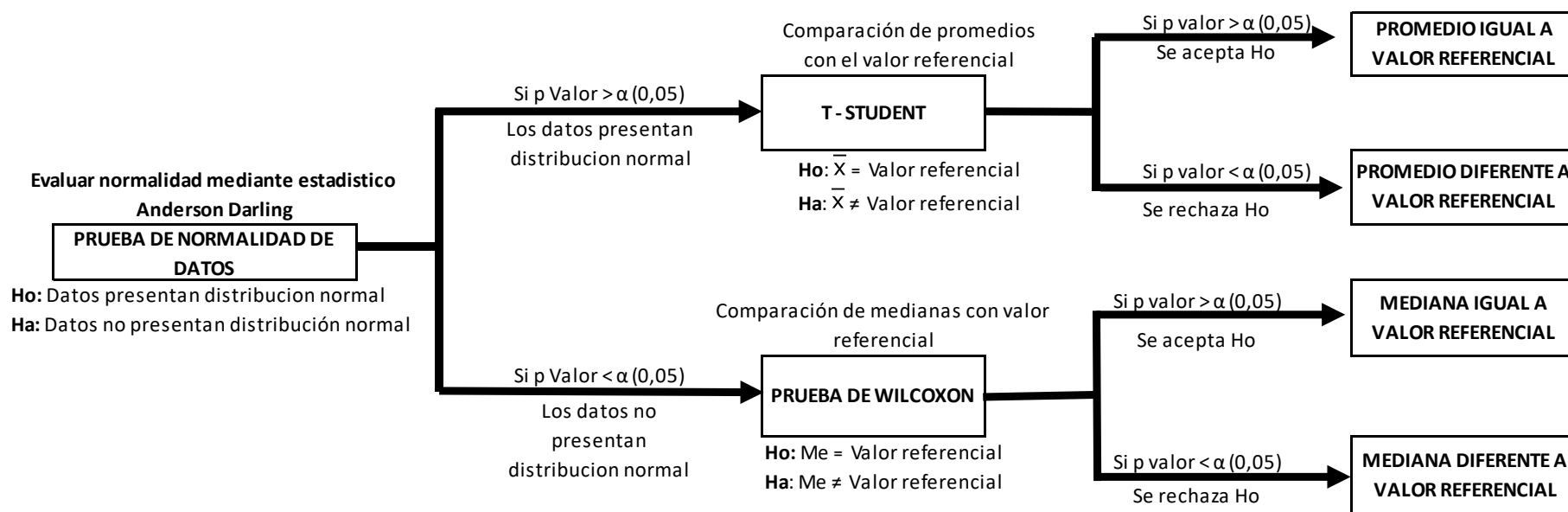
El estadístico a emplear para evaluar la normalidad de datos será la prueba de Anderson-Darling

Prueba de veracidad

Prueba empleada para determinar el grado de concordancia entre la medida de tendencia central (MTC) y un valor referencial conocido.

Si los datos presentan una distribución normal, el estadístico a emplear será la prueba de T-Student para una muestra, caso contrario si los datos presentan una distribución no normal, el estadístico a emplear será la prueba de Wilcoxon.

Tabla 10. Esquema para evaluación de la veracidad como diferencia de la respuesta instrumental de blancos comparada con un valor referencial de cero



3.4.1.3.1.1 Prueba de normalidad

Los 45 datos producto de las diferencias instrumental de los blancos fueron evaluados mediante la prueba de normalidad empleando el estadístico Anderson-Darling con un nivel de significancia (α) del 5% (0,05) para determinar la distribución que poseen los datos evaluados y la medida de tendencia central (MTC) que mejor los representa.

Evaluación de la normalidad de datos (Estadístico Anderson Darling)

Planteamiento de hipótesis

Ho: Los datos presentan distribución normal **valor $p \geq \alpha$ (0,05)**

Ha: Los datos no presentan distribución normal **valor $p < \alpha$ (0,05)**

Regla de decisión

- Si el valor p es mayor o igual al nivel de significancia de 0,05; Aceptar H_0 y concluir que los resultados presentan una distribución normal, por lo tanto, la medida de tendencia central (MTC) que es representativo para el conjunto de datos evaluados es el promedio o media poblacional.
- Si el valor p es menor a nivel de significancia de 0,05; Rechazar H_0 y concluir que los resultados presentan una distribución no normal, por lo tanto, la medida de tendencia central (MTC) que es representativo para el conjunto de datos evaluados es la mediana.

3.4.1.3.1.2 Prueba de veracidad

Si los datos presentan distribución normal

Evaluación de la veracidad (T-Student)

Ho: Promedio o media poblacional = Valor referencial **valor $p \geq \alpha$ (0,05)**

Ha: Promedio o media poblacional \neq Valor referencial **valor $p < \alpha$ (0,05)**

Regla de decisión

- Si el valor p es mayor o igual al nivel de significancia de 0,05; Aceptar Ho y concluir que el promedio o media poblacional de los resultados es estadísticamente igual al valor referencial
- Si el valor p es menor a nivel de significancia de 0,05; Rechazar Ho y concluir que el promedio o media poblacional de los resultados es estadísticamente diferente al valor referencial

Si los datos no presentan distribución normal

Evaluación de la veracidad (Prueba de Wilcoxon)

Ho: Mediana = Valor referencial **valor $p \geq \alpha$ (0,05)**

Ha: Mediana \neq Valor referencial **valor $p < \alpha$ (0,05)**

Regla de decisión

- Si el valor p es mayor o igual al nivel de significancia de 0,05; Aceptar Ho y concluir que la mediana de los resultados es estadísticamente igual al valor referencial
- Si el valor p es menor a nivel de significancia de 0,05; Rechazar Ho y concluir que la mediana de los resultados es estadísticamente diferente al valor referencial

3.4.1.4 Preparación blanco reactivo y cero instrumental

3.4.1.4.1 Blanco reactivo

En un recipiente de polipropileno, se tomó 1 mL del blanco, luego se agregó 160 µL de solución estabilizadora para posteriormente ser aforado a 4 mL con agua destilada.

3.4.1.4.2 Cero instrumental

En un recipiente de polipropileno, se tomó 1 mL de solución estabilizadora, se adicionó a una fiola de 25 mL y se aforó a volumen con agua destilada.

3.4.1.5 Elaboración de curva de calibración

Se preparó tres niveles de concentración a partir de una solución stock de potasio 1000 ppm de la siguiente manera:

3.4.1.5.1 Solución estándar de potasio 0,4 ppm

En una fiola de 250 mL se adicionó 0,1 mL de la solución madre stock de potasio 1000 ppm, se agregó 4 mL de Solución Estabilizadora de Cloruro de Cesio concentrado y se aforó a volumen con agua destilada.

3.4.1.5.2 Solución estándar de potasio 0,8 ppm

En una fiola de 250 mL se adicionó 0,2 mL de la solución madre stock de potasio 1000 ppm, se agregó 4 mL de Solución Estabilizadora de cloruro de cesio concentrado y se aforó a volumen con agua destilada.

3.4.1.5.3 Solución estándar de potasio 2,0 ppm

En una fiola de 250 mL se adicionó 0,5 mL de la solución madre stock de potasio 1000 ppm, se agregó 4 mL de solución estabilizadora de cloruro de cesio concentrado y se aforó a volumen con agua destilada.

3.4.1.6 Análisis por espectrometría de absorción atómica a la llama

El análisis por espectrometría de absorción atómica a la llama se realizó en el Centro de Información, Control Toxicológico y Apoyo a la Gestión Ambiental (CICOTOX) – Facultad de Farmacia y Bioquímica – UNMSM

3.4.1.6.1 Fundamento

En la espectrometría de absorción atómica a la llama (FAAS), se aspira una muestra líquida en una llama a través de un nebulizador. Mediante el nebulizador, la muestra se convierte en una niebla compuesta por gotitas uniformes que se introducen fácilmente en la llama. La llama desolvata y atomiza la muestra proveyendo una fuente de átomos o moléculas neutros para su análisis en el espectrofotómetro.

3.4.1.6.2 Condiciones espectrofotométricas del equipo

Llama: Aire –Acetileno

Flujo de aire: 3,5 mL/min.

Flujo de Acetileno: 1,5 mL/min.

Longitud de Onda: 769,9 nm

Ganancia Aproximada: Aproximadamente 80%.

3.4.1.6.3 Lectura de estándares para curva de calibración

CERO CAL: leer la solución cero instrumental

PATRÓN 1: leer la solución estándar 0,4 ppm

PATRÓN 2: leer la solución estándar 1,2 ppm

PATRÓN 3: leer la solución estándar 2,0 ppm

3.4.1.6.4 Lectura de muestras

BLANCO REACTIVO: leer la solución blanco reactivo

MUESTRA 1: leer la solución Muestra 1

MUESTRA 2: leer la solución Muestra 2 ⁴¹⁻⁴⁵.

4. RESULTADOS

4.1 Obtención del extracto etanólico liofilizado

El extracto etanólico liofilizado de propóleo procedente de Huaral y Ayacucho se ha obtenido mediante maceración con alcohol etílico 96° por 15 días en frasco de vidrio color ámbar el cual fue filtrado y llevado a estufa a 40°C para concentrar los solutos disueltos (Ver anexo 1) para posteriormente ser sometido al proceso de liofilización.

El extracto etanólico liofilizado de propóleo presenta las características descritas en la tabla 11.

Tabla 11. Características organolépticas del extracto etanólico liofilizado

Muestra	Cantidad obtenida posterior a liofilización	Aspecto	Olor
Propóleo Huaral	10,2 g	Coloración marrón claro (+)	Olor aromático (+)
Propóleo Ayacucho	11,7 g	Coloración marrón oscuro (++)	Olor aromático intenso (++)

Intensidad: (+): Poca (++) Moderada

4.2 Determinación de compuestos fenólicos y flavonoides totales

4.2.1. Análisis cualitativo

Se realizó mediante las reacciones con hidróxido de sodio y reacción con cloruro férrico para la identificación cualitativa de compuestos fenólicos (Anexo 2) y reacciones con acetato de plomo y reacción de Shinoda para la identificación cualitativa de flavonoides totales (Anexo 3).

Tabla 12. Resultados análisis cualitativo

Metabolito	Ensayos	Procedencia del propóleo	
		Ayacucho	Huaral
Compuestos fenólicos	Reacción con hidróxido de sodio	+++	++
	Reacción con cloruro férrico	+++	++
Flavonoides totales	Reacción con acetato de plomo	+++	++
	Reacción de Shinoda	+++	++

Intensidad: (+): Poca (++) Moderada (+++) Alta

4.2.2. Análisis cuantitativo

4.2.2.1. Cuantificación de flavonoides totales

4.2.2.1.1. Elaboración de curva de calibración

Para la construcción de la curva de calibración, se tomó como base la preparación de una solución madre de quercetina a 700 µg/mL a partir de la cual se hicieron diluciones a 4 niveles de concentración (2,8 µg/mL; 4,9 µg/mL; 9,8 µg/mL y 19,6 µg/mL según la tabla 13), los cuales fueron medidos a 415 nm en un espectrofotómetro UV-Visible obteniéndose como respuesta lo descrito en la tabla 14, a partir del cual se construyó, mediante regresión lineal, una curva de calibración con ecuación de la recta $y=0,0722474X$ (Figura 6)

Tabla 13. Niveles de concentración de soluciones estándar de quercetina para curva de calibración

Niveles de concentración			
Solución madre	Alícuota (volumen en µL)	Volumen de dilución (mL)	Concentración Final (µg/mL)
700 (µg/mL)	200	50	2,8
	350	50	4,9
	140	10	9,8
	280	10	19,6

Tabla 14. Respuesta obtenida a cuatro niveles de concentración

Niveles de concentración			
Nivel	Concentración Final (µg/mL)	Respuesta (Absorbancia) *	
1°	2,8	0,154	0,152 ± 0,002
		0,150	
		0,152	
2°	4,9	0,348	0,349 ± 0,002
		0,349	
		0,351	
3°	9,8	0,686	0,685 ± 0,001
		0,685	
		0,684	
4°	19,6	1,435	1,436 ± 0,002
		1,435	
		1,438	

Leyenda: * A la respuesta obtenida ya se ha restado la respuesta del blanco

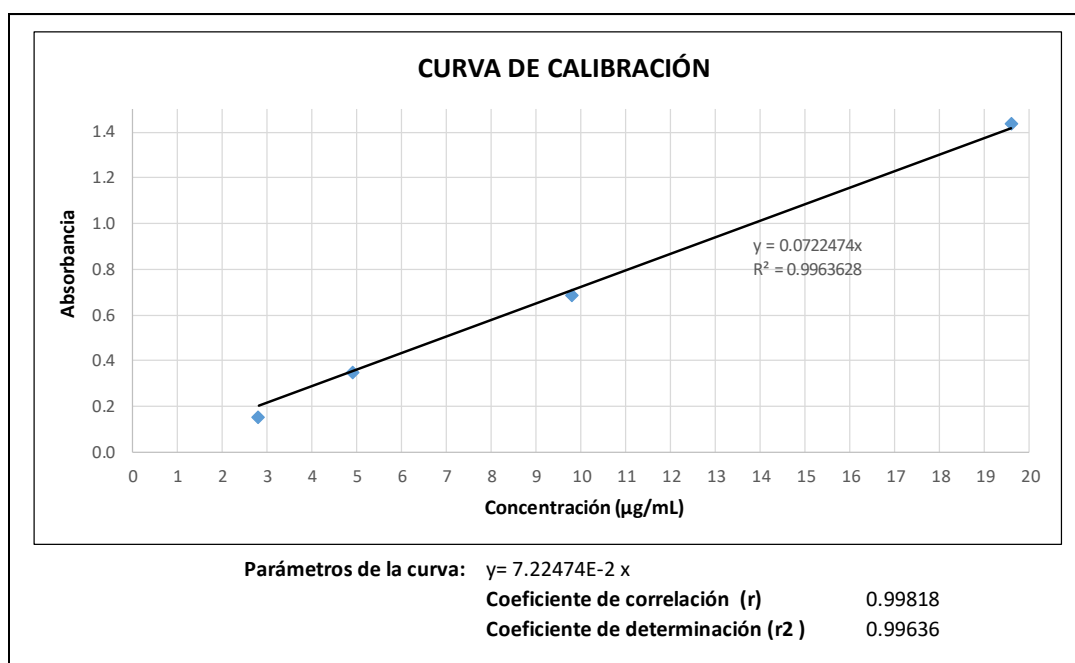


Figura 6. Curva de calibración a cuatro niveles de concentración

Observación:

- Curva de calibración a concentración de 2,8 µg/mL; 4,9 µg/mL; 9,8 µg/mL y 19,6 µg/mL de estándar de quercetina
- Ecuación de la recta calculada mediante regresión lineal $Y=0,0722474X$

4.2.2.1.2. Análisis de muestras

Para el análisis de las muestras de propóleo y determinar la concentración de flavonoides totales, se calculó el factor de dilución de las muestras según la formula descrita en **Figura 7**, obteniendo como factor de dilución (Fd) 10150,22 y 10330,58 correspondiente a muestras de propóleo Ayacucho y propóleo Huaral respectivamente, el cual es multiplicado por la concentración hallada en la solución muestra mediante espectrofotometría UV-Visible (**Tabla 16**) para obtener finalmente la concentración de flavonoides totales en las muestras de propóleo expresados como equivalente de quercetina. (**Tabla 17**)

Figura 7. Fórmula para el cálculo del factor de dilución

$$\frac{1}{Fd} = \frac{Wmp}{Diluc\ 1} \times \frac{Alicuota}{Diluc\ 2} \times \frac{Alicuota}{Diluc\ 2}$$

Donde:

Fd : Factor de dilución

Wmp : Peso de muestra problema

Diluc 1 : Primera dilución de la muestra

Diluc 2 : Segunda dilución

Alícuota : Alícuota tomada a partir de la solución anterior

Tabla 15. Cálculo del factor de dilución por muestra

MUESTRA	PESO DE MUESTRA	DILUCIÓN 1	DILUCIÓN 2		DILUCIÓN 3		FACTOR DE DILUCIÓN
			Alícuota 1	Aforo	Alícuota 2	Aforo	
Propóleo Huaral	0,4840 g	25 mL	10 mL	100 mL	0,5 mL	10 mL	10330,58
Propóleo Ayacucho	0,4926 g	25mL	10 mL	100 mL	0,5 mL	10 mL	10150,22

Tabla 16. Cálculo de la concentración hallada en solución muestra

Concentración hallada				
MUESTRA	Repetición	Respuesta (Absorbancia)	Concentración hallada ($\mu\text{g/mL}$)	Promedio concentración hallada ($\mu\text{g/mL}$)
Propóleo Huaral	1°	0,492	6,814	6,214 \pm 0,971
	2°	0,487	6,735	
	3°	0,368	5,094	
Propóleo Ayacucho	1°	0,595	8,237	8,470 \pm 0,268
	2°	0,633	8,763	
	3°	0,608	8,410	

Tabla 17. Concentración de flavonoides totales en muestras de propóleo expresados como equivalente de quercetina

MUESTRA	Promedio Concentración hallada ($\mu\text{g/mL}$)	Factor de dilución	Concentración de flavonoides totales (mg/mL)
Propóleo Ayacucho	8,470	10150,22	85,97 \pm 2,72
Propóleo Huaral	6,214	10330,58	64,20 \pm 10,03

4.2.2.2. Cuantificación de compuestos fenólicos

4.2.2.2.1. Elaboración de curva de calibración

Se tomó como base la preparación de una SM de “ácido gálico” a 100 µg/mL a partir de la cual se hicieron diluciones según la **tabla 18**, los cuales fueron medidos a 760 nm en el espectrofotómetro UV-Visible obteniéndose como respuesta lo descrito en la **tabla 19**, a partir del cual se construyó, mediante regresión lineal, una curva de calibración con ecuación de la recta $y=0,1336727X$ (**Figura 8**)

Tabla 18. Niveles de concentración de soluciones estándar de ácido gálico para curva de calibración

Niveles de concentración			
Solución madre	Alícuota (volumen en µL)	Volumen de dilución (mL)	Concentración Final (µg/mL)
100 (µg/mL)	100	10	1
	200	10	2
	300	10	3
	400	10	4
	500	10	5

Tabla 19. Respuestas obtenidas a cinco niveles de concentración

Niveles de concentración			
Nivel	Concentración Final (µg/mL)	Respuesta (Absorbancia) *	
1°	1	0,135	0,133 ± 0,002
		0,132	
		0,132	
2°	2	0,255	0,256 ± 0,002
		0,256	
		0,258	
3°	3	0,418	0,420 ± 0,002
		0,421	
		0,422	
4°	4	0,546	0,543 ± 0,003
		0,541	
		0,542	
5°	5	0,653	0,655 ± 0,004
		0,652	
		0,659	

Leyenda: * A la respuesta obtenida ya se ha restado la respuesta del blanco

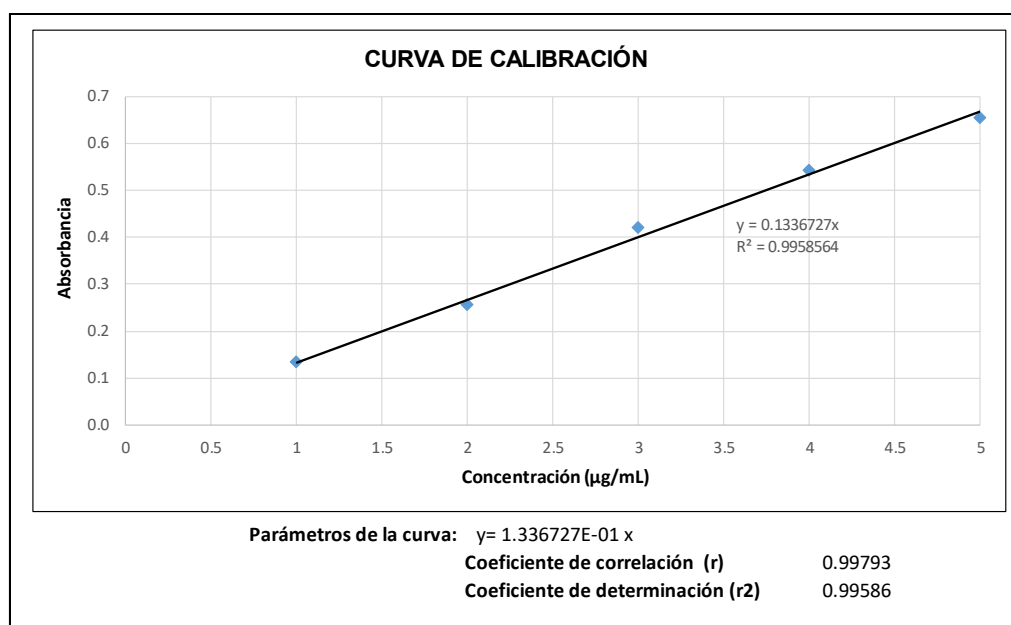


Figura 8. Curva de calibración a cinco niveles de concentración

Observación:

- Curva de calibración a cinco niveles de concentración a partir de estándar de ácido gálico
- Ecuación de la recta calculada mediante regresión lineal $Y=0,1336727X$

4.2.2.2.2. Análisis de muestras

Para el análisis de las muestras de propóleo y determinar la concentración de fenoles totales, se calculó el factor de dilución de las muestras según la formula descrita en **Figura 9**, obteniendo como factor de dilución (Fd) 9197,9397 y 7315,289 correspondiente a muestras de propóleo Ayacucho y propóleo Huaral respectivamente, el cual es multiplicado por la concentración hallada en la solución muestra mediante espectrofotometría UV-Visible (**Tabla 21**) para obtener finalmente la concentración de fenoles totales en las muestras de propóleo expresados como equivalente de ácido gálico. (**Tabla 22**)

Figura 9. Fórmula para el cálculo del factor de dilución

$$\frac{1}{Fd} = \frac{Wmp}{Diluc\ 1} \times \frac{Alicuota}{Diluc\ 2} \times \frac{Alicuota}{Diluc\ 2}$$

Donde:

Fd : Factor de dilución

Wmp : Peso de muestra problema

Diluc 1 : Primera dilución de la muestra

Diluc 2 : Segunda dilución

Alícuota : Alícuota tomada a partir de la solución anterior

Tabla 20. Cálculo del factor de dilución por muestra

MUESTRA	PESO DE MUESTRA	DILUCIÓN 1 (mL)	DILUCIÓN 2		DILUCIÓN 3		FACTOR DE DILUCIÓN
			Alícuota 1 (mL)	Aforo (mL)	Alícuota 2 (mL)	Aforo (mL)	
Propóleo Huaral	0,6835 g	25	1	50	2,5	10	7315,29
Propóleo Ayacucho	0,5436 g	25	1	50	2,5	10	9197,94

Tabla 21. Cálculo de la concentración hallada en solución muestra

Concentración hallada				
MUESTRA	Repetición	Respuesta (Absorbancia)	Concentración hallada ($\mu\text{g/mL}$)	Promedio concentración hallada ($\mu\text{g/mL}$)
Propóleo Huaral	1°	0,321	2,401	2,358 \pm 0,049
	2°	0,317	2,368	
	3°	0,308	2,304	
Propóleo Ayacucho	1°	0,462	3,456	3,475 \pm 0,148
	2°	0,485	3,631	
	3°	0,446	3,337	

Tabla 22. Concentración de fenoles totales en muestras de propóleo expresados como equivalente de ácido gálico

MUESTRA	Promedio concentración hallada ($\mu\text{g/mL}$)	Factor de dilución	Concentración de fenoles totales (mg/mL)
Propóleo Ayacucho	3,475	9197,94	31,96 \pm 1,36
Propóleo Huaral	2,358	7315,29	17,25 \pm 0,36

4.3. Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico liofilizado de propóleo sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

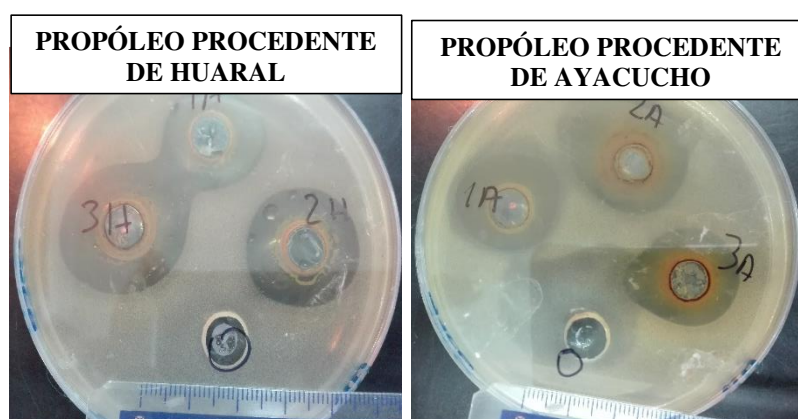
4.3.1. Método de “difusión en agar”

Los resultados para la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos liofilizados de propóleo evaluados mediante el método de difusión en agar se describen la **Tabla 23, Figura 10 y Figura 11**.

Tabla 23. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos liofilizado de propóleo procedente de Ayacucho y procedente de Huaral mediante el método de difusión en agar.

Muestra		Diámetro de “halo de inhibición” (mm)			
		“ <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538”		“ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027”	
Propóleo Huaral	10%	20	19,67 ± 1,53	16	16,33 ± 0,58
		21		16	
		18		17	
	20%	22	21,67 ± 0,58	25	25,33 ± 1,53
		21		27	
		22		24	
	30%	26	26,00 ± 1,00	26	26,00 ± 1,00
		25		27	
		27		25	
Propóleo Ayacucho	10%	21	20,67 ± 0,58	21	20,33 ± 1,15
		20		21	
		21		19	
	20%	22	22,67 ± 0,58	22	22,00 ± 1,00
		23		21	
		23		23	
	30%	28	27,67 ± 0,58	25	26,00 ± 1,00
		27		26	
		28		27	

Figura 10. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos liofilizados de propóleo procedente de Huaral y Ayacucho a concentración de 10%, 20% y 30% por el método de “difusión en agar” contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538



Leyenda:

0: Control negativo alcohol etílico 96%

1H: Extracto etanólico liofilizado de propóleo Huaral al 10% en etanol 96%

2H: Extracto etanólico liofilizado de propóleo Huaral al 20% en etanol 96%

3H: Extracto etanólico liofilizado de propóleo Huaral al 30% en etanol 96%

1A: Extracto etanólico liofilizado de propóleo Ayacucho 10% en etanol 96%

2A: Extracto etanólico liofilizado de propóleo Ayacucho 20% en etanol 96%

3A: Extracto etanólico liofilizado de propóleo Ayacucho 30% en etanol 96%

Figura 11. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos liofilizados de propóleo procedente de Huaral y Ayacucho a concentración de 10%, 20% y 30% por el método de “difusión en agar” contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.



Leyenda:

0: Control negativo alcohol etílico 96%

1H: Extracto etanólico liofilizado de propóleo Huaral al 10% en etanol 96%

2H: Extracto etanólico liofilizado de propóleo Huaral al 20% en etanol 96%

3H: Extracto etanólico liofilizado de propóleo Huaral al 30% en etanol 96%

1A: Extracto etanólico liofilizado de propóleo Ayacucho 10% en etanol 96%

2A: Extracto etanólico liofilizado de propóleo Ayacucho 20% en etanol 96%

3A: Extracto etanólico liofilizado de propóleo Ayacucho 30% en etanol 96%

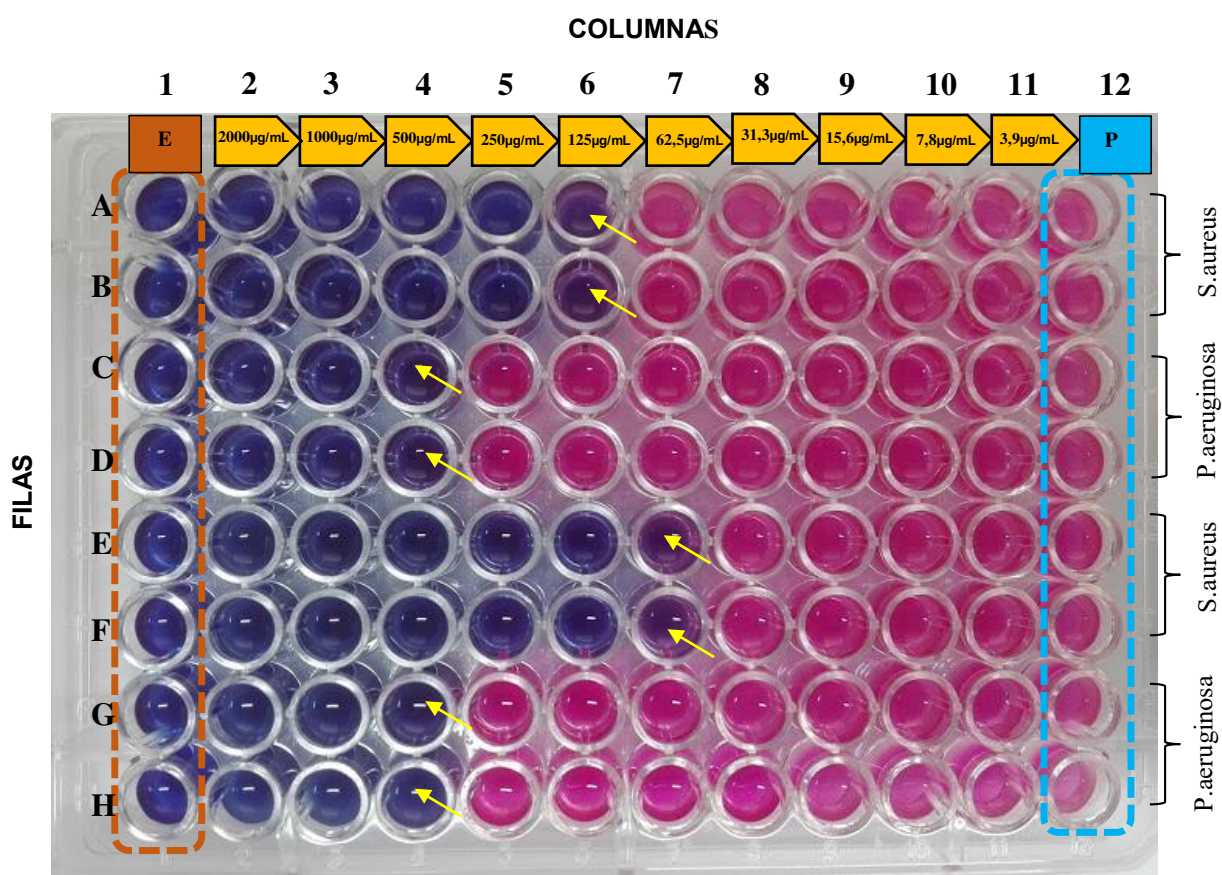
4.3.2. Determinación del CMI por el método de microdilución colorimétrica.

En la Figura 12, se observa La distribución de las reacciones en los 96 pocillos de microplaca en “U”, los cuales posterior la incubación se evidencia en la columna 1 una coloración azulada correspondiente al control de esterilidad (Resazurina + Caldo Mueller Hinton), en la columna 12 se evidencia una coloración rosa indicativo de una proliferación celular, en las columnas desde la 2 hasta la 11 se observa la coloración de las reacciones entre las muestras doblemente seriadas y los inóculos correspondientes a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

La última coloración azul violeta indicativo de la concentración mínima que inhibe el crecimiento bacteriano por parte de las muestras de propóleo evaluadas corresponde a las siguientes posiciones en la microplaca:

- En las posiciones (Fila A, Columna 6) y (Fila B, Columna 6), un CMI de **125 µg/mL** correspondiente a la muestra de propóleo Huaral sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
- En las posiciones (Fila E, Columna 7) y (Fila F, Columna 7), un CMI de **62,5 µg/mL** correspondiente a la muestra de propóleo Ayacucho sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
- En las posiciones (Fila C, Columna 4) y (Fila D, Columna 4), un CMI de **500 µg/mL** correspondiente a la muestra de propóleo Huaral sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- En las posiciones (Fila G, Columna 4) y (Fila H, Columna 4), un CMI de **500 µg/mL** correspondiente a la muestra de propóleo Ayacucho sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Figura 12. Determinación de la CMI en muestras de propóleo sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

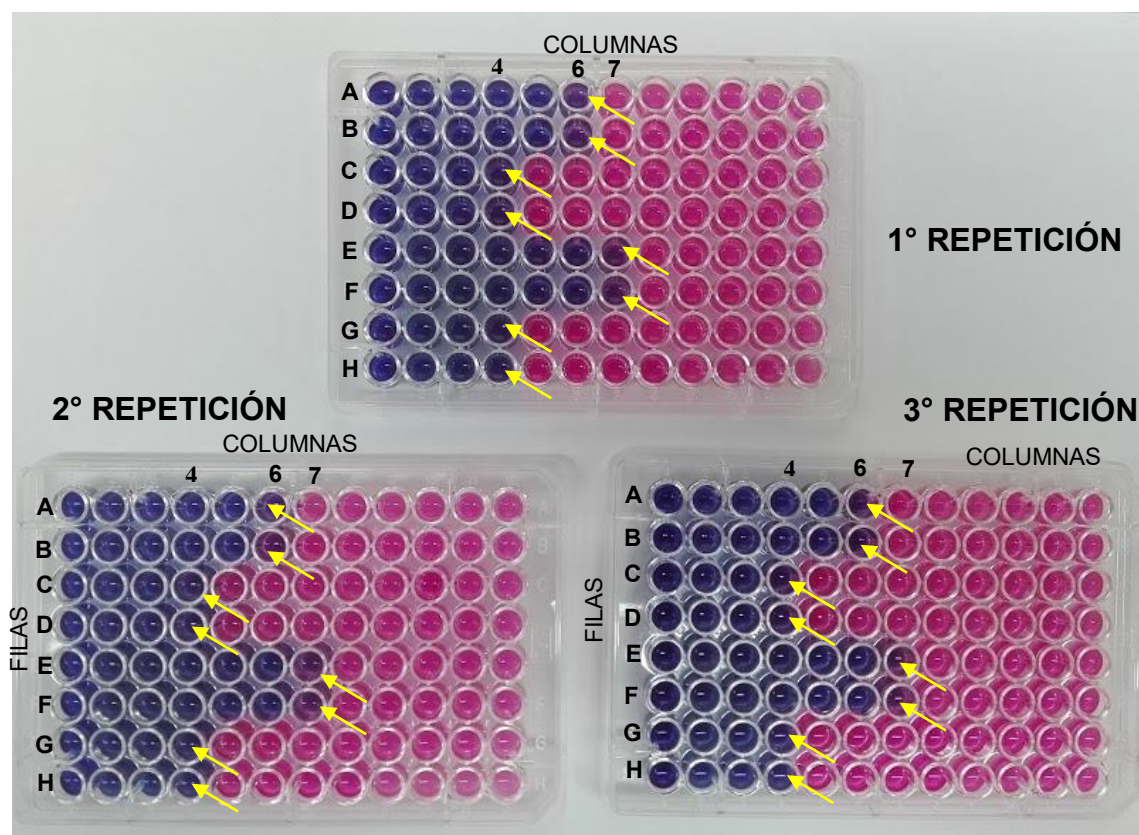


Leyenda: E: “Control de esterilidad” P: “Control positivo”

Consideraciones:

- Ensayo de microdilución empleando como muestra propóleo Huaral distribuidos en las filas **A,B,C** y **D**
- Ensayo de microdilución empleando como muestra propóleo de Ayacucho distribuidos en las filas **E,F,G** y **H**
- En las filas **A,B** y **E,F** se distribuyen los inóculos de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- En las filas **C,D** y **G,H** se distribuyen los inóculos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Figura 13. Repeticiones del ensayo de determinación de la CMI en muestras de propóleo sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027



Consideraciones:

- Se realizaron tres repeticiones del ensayo de “determinación de la concentración mínima inhibitoria por el método de microdilución colorimétrica”, obteniendo los mismos resultados en todas las repeticiones realizadas.
- Las flechas indican la concentración mínima inhibitoria (CMI) hallada para las muestras de propóleo Huaral y propóleo Ayacucho sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Tabla 24. Resultados de las lecturas de CMI de las muestras de propóleo sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

MUESTRA	PROCEDENCIA	TIPO DE EXTRACTO	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (µg/mL)		
			<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538		
			Repetición	Resultados (µg/mL)	
Propóleo	Huaral (Lima)	Etanólico	1°	125	125 ± 0
			2°	125	
			3°	125	
Propóleo	Huamanga (Ayacucho)	Etanólico	1°	62,5	62,5 ± 0
			2°	62,5	
			3°	62,5	

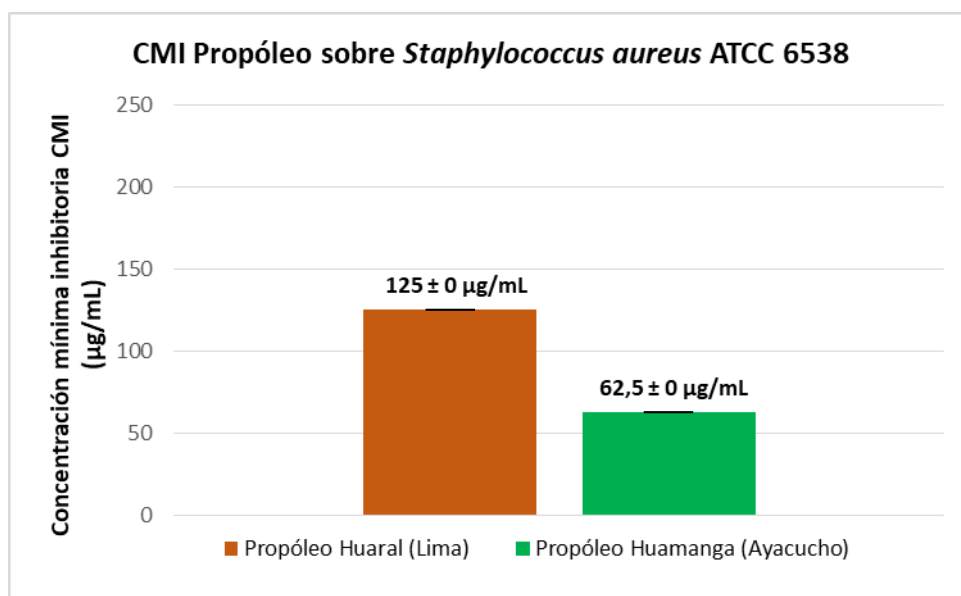


Figura 14. Comparativo CMI de las muestras de propóleo Huaral y propóleo Ayacucho sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Tabla 25. Resultados de las lecturas de CMI de las muestras de propóleo sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

MUESTRA	PROCEDENCIA	TIPO DE EXTRACTO	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (µg/mL)		
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027		
			Repetición	Resultados (µg/mL)	
Propóleo	Huaral (Lima)	Etanólico	1°	500	500 ± 0
			2°	500	
			3°	500	
Propóleo	Huamanga (Ayacucho)	Etanólico	1°	500	500 ± 0
			2°	500	
			3°	500	

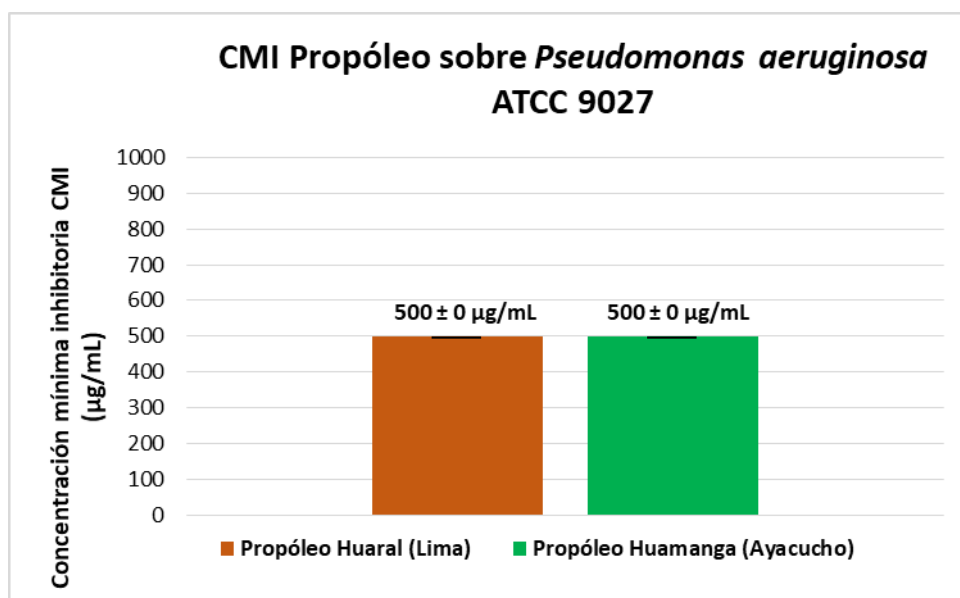


Figura 15. Comparativo CMI de las muestras de propóleo Huaral y propóleo Ayacucho sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

4.4. Evaluación del daño a la membrana citoplasmática

4.4.1. Método de cuantificación de potasio asociada a lisis celular

4.4.1.1. Elaboración de curva de calibración

Se prepararon tres niveles de concentración (0,4 mg/L; 0,8 mg/L y 2,0 mg/L según la **tabla 26**) a partir de una solución stock de potasio 1000 ppm (1000 mg/L), los cuales fueron medidos a 769,9 nm en el espectrómetro a la llama obteniéndose como respuesta lo descrito en la **tabla 27**, a partir del cual se construyó, mediante regresión lineal, una curva de calibración con ecuación de la recta $y=0,10933X + 0,0175$ (**Figura 16**)

Tabla 26. Niveles de concentración a partir de solución stock de potasio

Niveles de concentración				
Solución stock	Alícuota (mL)	Solución estabilizadora (mL)	Volumen de dilución (mL)	Concentración Final (mg/L)
1000 (mg/L)	0,1	4	250	0,4
	0,2	4	250	0,8
	0,5	4	250	2,0

Tabla 27. Respuestas obtenidas a tres niveles de concentración

Niveles de concentración			
Nivel	Concentración Final (mg/L)	Respuesta (Absorbancia) *	
1°	0,4	0,059	0,061 ± 0,002
		0,062	
		0,062	
2°	0,8	0,109	0,108 ± 0,003
		0,110	
		0,105	
3°	2,0	0,236	0,235 ± 0,001
		0,234	
		0,235	

Leyenda: * A la respuesta obtenida ya se ha restado la respuesta del blanco

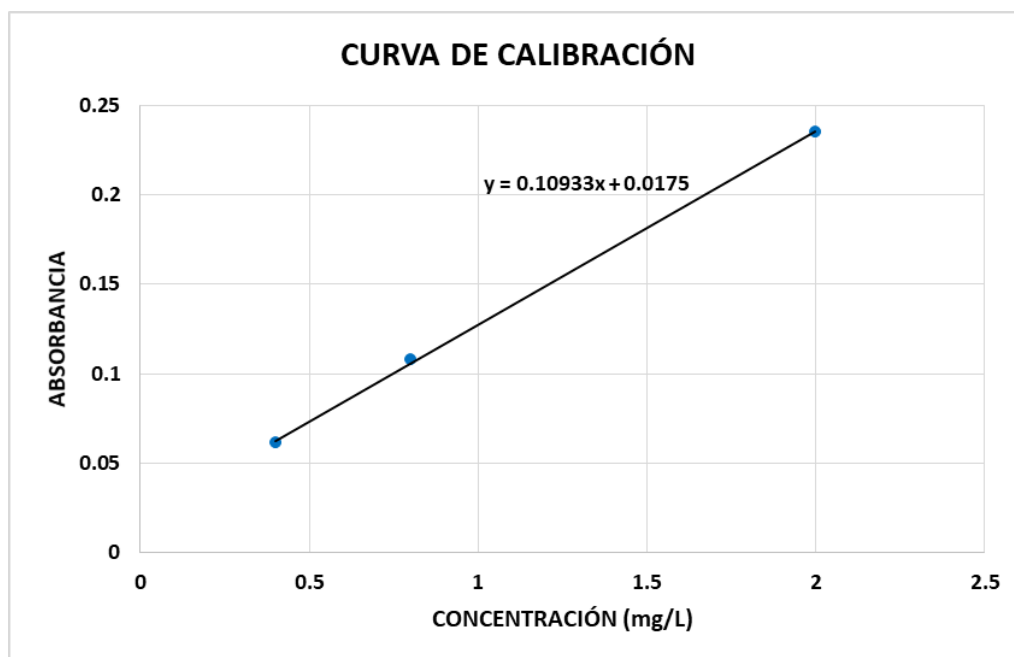


Figura 16. Curva de calibración a tres niveles de concentración

Observación:

- Curva de calibración a concentración de 0,4 mg/L; 0,8 mg/L y 2,0 mg/L de estándar de potasio 1000 ppm (1000 mg/L)
- Ecuación de la recta calculada mediante regresión lineal $Y=0,10933X + 0,0175$

4.4.1.2. Análisis de muestras

Las muestras de propóleo fueron medidos a 769,9 nm en el espectrómetro a la llama obteniéndose como respuesta lo descrito en la **tabla 28** “Respuesta instrumental de propóleo Huaral” y **tabla 29** “Respuesta instrumental de propóleo Ayacucho”, dichos resultados fueron evaluados como tendencia en **figura 17**

Tabla 28. Respuesta instrumental de solución muestra propóleo Huaral

MUESTRA	TIEMPO	REPETICIÓN	RESPUETA (Abs)		CONCENTRACIÓN (mg/L)		PORCENTAJE
Solución muestra de Propóleo Huaral	T0= 0 Horas	1°	0,200	0,200	1,6693	1,6647 ± 0,0065	100%
		2°	0,199		1,6601		
	T1= 2 Horas	1°	0,203	0,204	1,6967	1,7013 ± 0,0064	102,20%
		2°	0,204		1,7058		
	T2= 4 Horas	1°	0,217	0,215	1,8248	1,8065 ± 0,0259	108,52%
		2°	0,213		1,7882		
	T3= 6 Horas	1°	0,221	0,222	1,8613	1,8705 ± 0,0129	112,36%
		2°	0,223		1,8796		
	T4= 12Horas	1°	0,225	0,227	1,8979	1,9162 ± 0,0259	115,11%
		2°	0,229		1,9345		

Tabla 29. Respuesta instrumental de solución muestra propóleo Ayacucho

MUESTRA	TIEMPO	REPETICIÓN	RESPUETA (Abs)		CONCENTRACIÓN (mg/L)		PORCENTAJE
Solución muestra de Propóleo Ayacucho	T0= 0 Horas	1°	0,200	0,201	1,6693	1,6738 ± 0,0064	100%
		2°	0,201		1,6784		
	T1= 2 Horas	1°	0,219	0,219	1,8430	1,8385 ± 0,0064	109,84%
		2°	0,218		1,8339		
	T2= 4 Horas	1°	0,224	0,224	1,8888	1,8842 ± 0,0065	112,57%
		2°	0,223		1,8796		
	T3= 6 Horas	1°	0,227	0,228	1,9162	1,9208 ± 0,0065	114,76%
		2°	0,228		1,9254		
	T4= 12Horas	1°	0,231	0,231	1,9528	1,9482 ± 0,0064	116,39%
		2°	0,230		1,9437		

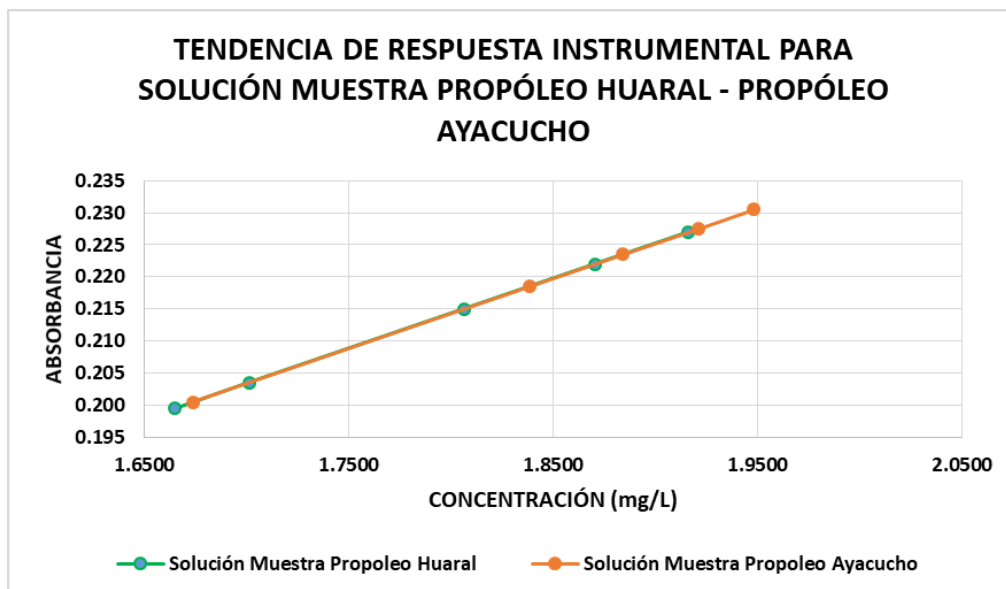


Figura 17. Tendencia de respuesta instrumental solución muestra propóleo Huaral y propóleo Ayacucho

Observación:

- La solución muestra propóleo Huaral logra generar un aumento de la concentración de potasio desde 1,6647 mg/L a tiempo 0 Horas de incubación hasta 1,9162 mg/L a tiempo 12 horas de incubación.
- La solución muestra propóleo Ayacucho logra generar un aumento de la concentración de potasio desde 1,6738 mg/L a tiempo 0 Horas de incubación hasta 1,9482 mg/L a tiempo 12 horas de incubación.
- En las soluciones muestras evaluadas se observa un aumento de las concentraciones de potasio a medida que aumenta el tiempo de incubación de 0, 2, 4, 6 y 12 horas de incubación
- En las primeras 4 horas de incubación se observa un mayor incremento de concentración de potasio, con un 8,52% de incremento para la solución muestra propóleo de Huaral y un 12,57% para la solución muestra propóleo procedente de Ayacucho
- En 12 horas de incubación se obtiene un incremento de potasio de 15,11% para la solución muestra propóleo de Huaral y un 16,39% solución muestra propóleo de Ayacucho.

4.4.1.3. Evaluación de respuesta instrumental de blancos (análisis de blancos)

La respuesta instrumental a tiempo 0, 2, 4, 6 y 12 Horas de incubación a 37°C se encuentran descritos en la tabla 30, Los cuales fueron agrupados y restados entre si hasta obtener los datos descritos en tabla 31.

Tabla 30. Respuesta instrumental obtenida en lectura de blanco

MUESTRA	TIEMPO	ID BLANCOS	RESPUETA(Abs)	CONCENTRACIÓN (mg/L)	
BLANCO	T0= 0 Horas	T0 M1	0,200	1,6702	1,6684 ± 0,0026
		T0 M2	0,200	1,6665	
	T1= 2 Horas	T1 M1	0,200	1,6729	1,6706 ± 0,0033
		T1 M2	0,200	1,6683	
	T2= 4 Horas	T2 M1	0,201	1,6738	1,6720 ± 0,0025
		T2 M2	0,200	1,6702	
	T3= 6 Horas	T3 M1	0,200	1,6674	1,6729 ± 0,0078
		T3 M2	0,201	1,6784	
	T4= 12Horas	T4 M1	0,200	1,6674	1,6656 ± 0,0025
		T4 M2	0,199	1,6638	

Tabla 31. Diferencias de respuesta instrumental obtenida en lectura de blanco a evaluar en programa Minitab

N°	DIFERENCIAS DE BLANCOS	RESPUESTA (Abs)
1	T0 M1 - T0 M2	0,0037
2	T0 M1 - T1 M1	-0,0027
3	T0 M1 - T1 M2	0,0018
4	T0 M1 - T2 M1	-0,0037
5	T0 M1 - T2 M2	0,0000
6	T0 M1 - T3 M1	0,0027
7	T0 M1 - T3 M2	-0,0082
8	T0 M1 - T4 M1	0,0027
9	T0 M1 - T4 M2	0,0064
10	T0 M2 - T1 M1	-0,0064
11	T0 M2 - T1 M2	-0,0018
12	T0 M2 - T2 M1	-0,0073
13	T0 M2 - T2 M2	-0,0037
14	T0 M2 - T3 M1	-0,0009
15	T0 M2 - T3 M2	-0,0119
16	T0 M2 - T4 M1	-0,0009
17	T0 M2 - T4 M2	0,0027
18	T1 M1 - T1 M2	0,0046
19	T1 M1 - T2 M1	-0,0009
20	T1 M1 - T2 M2	0,0027
21	T1 M1 - T3 M1	0,0055
22	T1 M1 - T3 M2	-0,0055
23	T1 M1 - T4 M1	0,0055
24	T1 M1 - T4 M2	0,0091
25	T1 M2 - T2 M1	-0,0055
26	T1 M2 - T2 M2	-0,0018
27	T1 M2 - T3 M1	0,0009
28	T1 M2 - T3 M2	-0,0101
29	T1 M2 - T4 M1	0,0009
30	T1 M2 - T4 M2	0,0046
31	T2 M1 - T2 M2	0,0037
32	T2 M1 - T3 M1	0,0064
33	T2 M1 - T3 M2	-0,0046
34	T2 M1 - T4 M1	0,0064
35	T2 M1 - T4 M2	0,0101
36	T2 M2 - T3 M1	0,0027
37	T2 M2 - T3 M2	-0,0082
38	T2 M2 - T4 M1	0,0027
39	T2 M2 - T4 M2	0,0064
40	T3 M1 - T3 M2	-0,0110
41	T3 M1 - T4 M1	0,0000
42	T3 M1 - T4 M2	0,0037
43	T3 M2 - T4 M1	0,0110
44	T3 M2 - T4 M2	0,0146
45	T4 M1 - T4 M2	0,0037
--	--	--

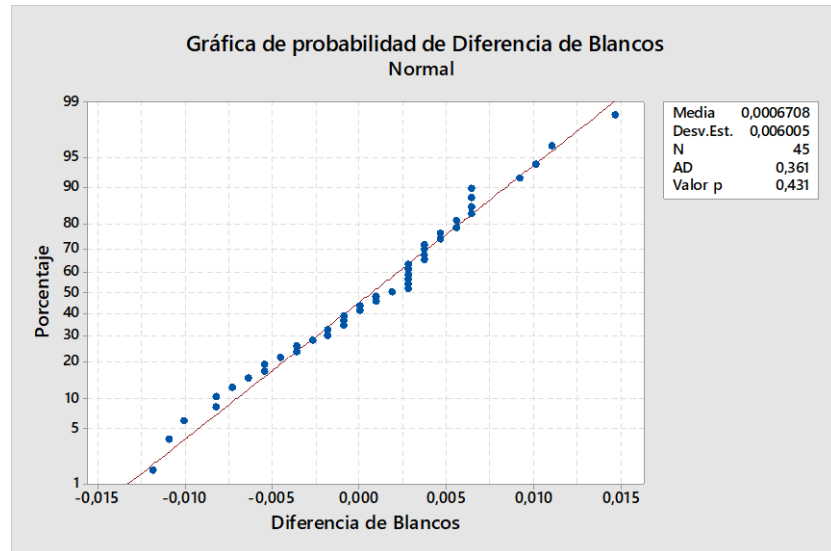


Figura 18. Evaluación de la normalidad de datos mediante estadístico Anderson-Darling

Observación:

- Figura obtenida luego de procesar los 45 datos obtenidos de las diferencias de respuesta instrumental de blancos incubados a tiempo 0,2,4,6 y 12 horas a 37°C mediante el estadístico Anderson Darling, observándose un Valor p de 0,431, el cual es superior al nivel de significancia α (0,05) por lo cual se acepta la hipótesis nula (H_0) donde se plantea que los datos presentan una distribución normal.
- Los datos evaluados al tener una distribución normal, la medida de tendencia central (MTC) que mejor los representa es el promedio o la media poblacional.

Gráfica de probabilidad de Diferencia de Blancos

Gráfica de probabilidad de Diferencia de Blancos

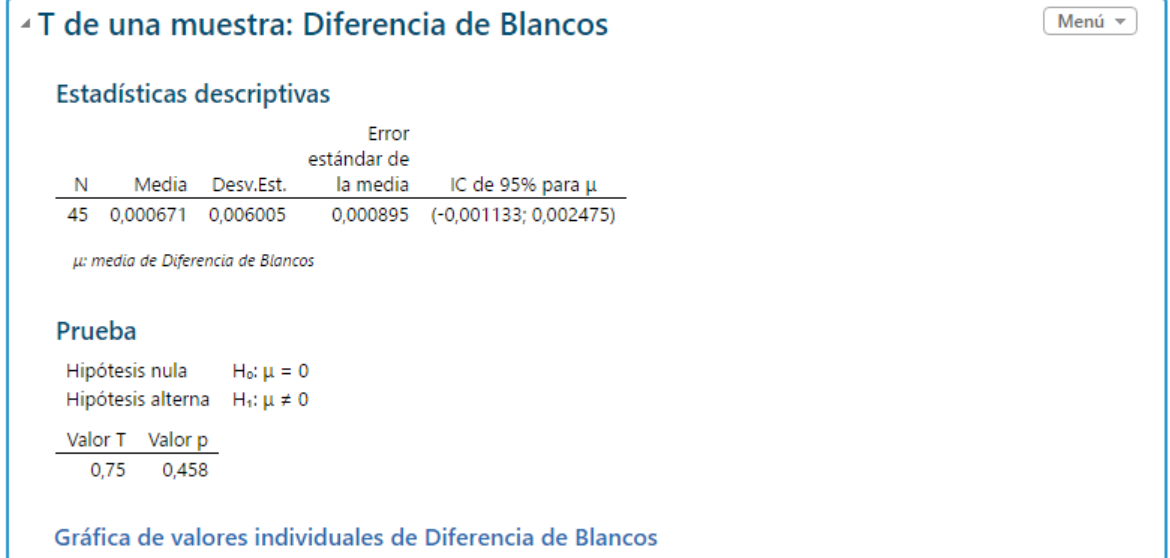


Figura 19. Evaluación de la veracidad de datos mediante estadístico T-Student

Observación:

- En la figura se observa un valor p de 0,458; el cual es superior al nivel de significancia α (0,05) por lo cual se acepta la hipótesis nula (H_0) donde se plantea que los datos evaluados representados por la media poblacional es equivalente a cero a un 95% de confianza

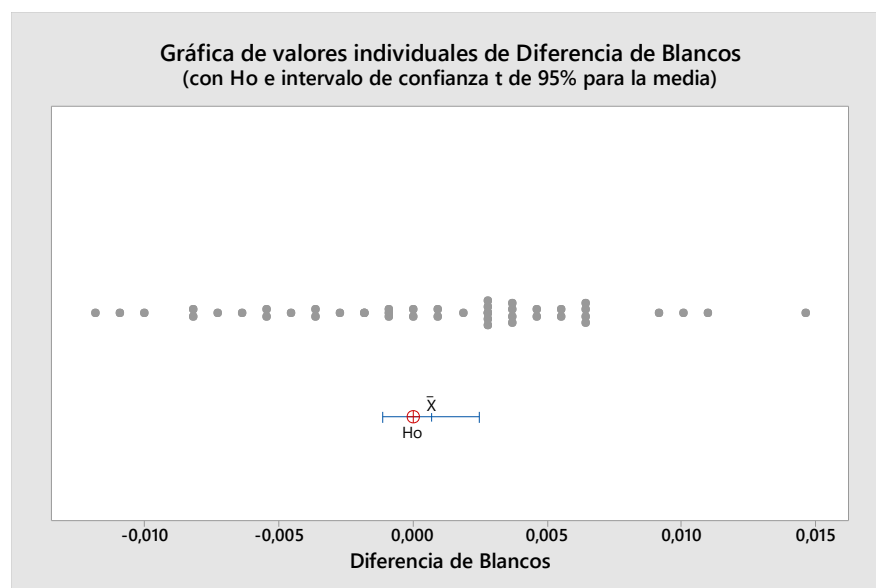


Figura 20. Valores individuales para diferencia de blancos en evaluación de la veracidad

Observación:

- Se observa los valores individuales de las diferencias de blancos, representados por la media, la cual presenta un intervalo de confianza al 95% que abarca el rango desde - 0,001133 hasta 0,002475

5. DISCUSIÓN

El propóleo ha sido utilizado desde tiempos antiguos en medicina tradicional debido a las propiedades terapéuticas que presenta entre las que destaca la capacidad antimicrobiana atribuido a la gran diversidad de flavonoides y compuestos fenólicos presentes en su constitución.

El presente estudio está enfocado en evaluar la “actividad antimicrobiana” de los extractos etanólicos liofilizados de propóleo procedentes de Ayacucho y Huaral sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, bacterias que están incluidas como prioridad 1 (Crítica) y prioridad 2 (Alta) en la lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos publicado por la organización mundial de la salud⁵.

En el análisis cualitativo se demostró que el extracto etanólico liofilizado de propóleo procedente de Ayacucho presenta mayor contenido de “compuestos fenólicos” y “flavonoides totales” que el extracto etanólico liofilizado de Huaral, lo cual se confirma con los resultados obtenidos por Soto⁴⁶ (2015) donde encontró que el propóleo procedente de Ayacucho presenta mayor cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides que los propóleos procedentes de Piura y Pucallpa.

En el análisis cuantitativo se encontró que el extracto etanólico liofilizado de Ayacucho presenta una concentración de flavonoides totales 85,97 mg EQ/g y una concentración de fenoles totales 31,96 mg EAG/g, lo cual es mayor a lo encontrado en el extracto etanólico liofilizado de Huaral con una concentración para flavonoides totales 64,2 mg EQ/g y una concentración de fenoles totales 17,25 mg EAG/g, manteniéndose como mayor concentración de “compuestos fenólicos” y “flavonoides totales” al extracto etanólico liofilizado procedente de Ayacucho demostrado por Soto⁴⁶ (2015) donde obtuvo una concentración de flavonoides totales 42,5 mg EQ/g y compuestos fenólicos 78,6 mg EAG/g en muestras de propóleo procedente de Ayacucho en comparación a los de Piura y Pucallpa.

En la evaluación de la “actividad antimicrobiana” se consideró como primer ensayo el método de “difusión en agar” con el microorganismo de prueba *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, obteniendo halos de inhibición de 20,33 mm; 22 mm y 26 mm en muestra de propóleo Ayacucho y 16,33 mm; 25,33 mm y 26 mm en muestra de propóleo Huaral, de la misma manera empleando *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 se obtuvo halos de inhibición de 20,67mm; 22,67mm y 22,67mm en muestra de propóleo Ayacucho y 19,67 mm; 21,67 mm y 26 mm en muestra de propóleo Huaral, según Rodríguez *et al.*⁴⁷ (2020), en la evaluación de la actividad antimicrobiana de muestras de propóleo procedentes de México empleó el método de “difusión en agar” sobre *Staphylococcus aureus*, considerando adicionar chalconas para incrementar el efecto antibacteriano de propóleo, obteniendo halos de inhibición de 14 mm, superior al obtenido por el extracto de propóleo de 12 mm sin la adición de chalconas, por lo cual se atribuye a los propóleos de Ayacucho y Huaral una mayor actividad antimicrobiana.

El segundo ensayo ejecutado fue la determinación de la concentración mínima que inhibe el crecimiento microbiano mediante el método de microdilución colorimétrica³³ encontrándose que el extracto etanólico liofilizado de propóleo procedente de Ayacucho presenta un CMI de 62,5 µg/mL sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y un CMI de 500 µg/mL contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 así mismo en las muestras de propóleo Huaral se obtuvo un CMI de 125 µg/mL sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y un CMI de 500 µg/mL contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, los resultados concuerdan con lo reportado por Fonte *et al.*⁴⁸ (2016) en el cual se determinó que muestras de propóleo procedente de Cuba tienen una concentración mínima inhibitoria entre 70 µg/mL y 150 µg/mL sobre *Staphylococcus aureus*, sin embargo sobre *Pseudomonas aeruginosa* hay diferencias en los valores de CMI que oscilan entre 40 µg/mL y 70 µg/mL, esto se puede atribuir a las características de la flora nativa en lugar de origen y al tipo de extracción del propóleo.

Los extractos etanólicos que presentaron un CMI menor de 500 µg/mL fueron sometidos al ensayo de “cuantificación de potasio asociada a lisis celular” (tercer ensayo) en el cual se cuantificó mediante el método de espectrometría de absorción atómica a la llama, la cantidad de potasio perdido por las células de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, encontrándose que la respuesta instrumental de las muestras de propóleo procedente de Huaral y Ayacucho presentan una tendencia ascendente con una mayor cuantificación de potasio a medida que aumenta el tiempo de incubación, también se determina que en a las 12 horas de incubación se obtiene un incremento de potasio del 15,11% para la solución muestra propóleo de Huaral y un 16,39% para la solución muestra propóleo de Ayacucho, acorde a los resultados reportados por Cushnie y Lamb⁴⁹ (2005) en el cual determinaron que la galangina (Metabolito con capacidad antibacteriana presente en el propóleo) a concentración de 50 µg/mL genera en poblaciones de 1×10^9 ufc/mL de *Staphylococcus aureus* incubado durante 12 horas una pérdida mayor a 21% de potasio en comparación a las poblaciones de control no tratadas, evidenciando que la galangina provoca un aumento significativo en la pérdida de potasio de las células de *Staphylococcus aureus*, esto atribuido a daño en la membrana citoplasmática y consecuente lisis celular.

El aumento de la concentración de potasio en el ensayo de “cuantificación de potasio asociada a lisis celular” no se debe a factores externos puesto que la viabilidad del *Staphylococcus aureus* no se ve alterada, la respuesta instrumental los blancos es equivalente a cero y no aporta variabilidad significativa en la cuantificación de potasio asociada a la lisis celular generada por las muestras de propóleo, acorde a lo encontrado por Cushnie y Lamb⁴⁹ (2005) donde demostraron que las células de *Staphylococcus aureus* no pierden viabilidad después de 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 12 horas de incubación a 37°C en un medio que contiene una población de 5×10^7 ufc/mL de *Staphylococcus aureus*, BSA al 0,625% y DMSO.

6. CONCLUSIONES

- En los extractos etanólicos liofilizados de propóleo, mediante análisis cualitativo, se evidenció la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides totales; así mismo a través del análisis cuantitativo, el extracto de Ayacucho presentó mayor concentración de compuestos fenólicos 31,96 mg/mL y flavonoides totales de 85,97 mg/mL.
- Los extractos de propóleo procedentes de Ayacucho y Huaral presentan actividad antimicrobiana sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, presentando el extracto de Ayacucho mayor actividad antimicrobiana; así mismo ambos extractos presentan actividad antimicrobiana significativa.
- Se evidencia que ambos extractos generan un aumento de las concentraciones de potasio a medida que aumenta el tiempo de incubación y luego de 12 horas se obtiene un incremento de potasio de la solución muestra de propóleo de Huaral y Ayacucho de 15,11% y 16,39% respectivamente; así mismo la diferencia de los blancos representados por la media poblacional es equivalente a cero a un 95% de confianza con IC entre -0,001133 y 0,002475, lo cual indica que la respuesta instrumental de los blancos es constante y la respuesta instrumental de las muestras se debe únicamente a las propiedades del propóleo y no a factores externos.

7. RECOMENDACIONES

1. Optimizar el uso del método de Espectrometría de Absorción Atómica a la Llama para la cuantificación de potasio.
2. Realizar estudios en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Realizar estudios de actividad antimicrobiana en marcas comerciales de propóleo de distintas regiones del Perú.
4. Realizar estudios de los posibles mecanismos de acción del propóleo sobre microorganismos patógenos farmacoresistentes.
5. Realizar estudios de posibles moléculas con actividad terapéutica proveniente de metabolitos secundarios del propóleo.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Farré R, Frassetto I, Sánchez A. El propolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*. 2004; 45(1):21-43.
2. Palomino LR, Martínez JP, García CM, Gil JH, Durango DL. Caracterización Físicoquímica y Actividad Antimicrobiana del Propóleo en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*. 2010; 63(1): 5373-5383.
3. Velasquez BD, Montenegro SP. Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de propóleos obtenidos de abejas *Apis mellifera*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 2017; 8(1):185-193.
4. El-Guendouz S, Aazza S, Lyoussi B, Bankova V, Popova M, Neto L, et al. Moroccan Propolis: A Natural Antioxidant, Antibacterial, and Antibiofilm against *Staphylococcus aureus* with No Induction of Resistance after Continuous Exposure. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018 Nov ;2018:1-19.
5. Antibacterial agents in clinical development. World Health Organization 2017. 2017 Sep:1-48.
6. Simone-Finstrom M, Spivak M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*. 2010; 41:295–311.
7. Bankova V, De Castro S, Marcucci M. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. 2000; 31 (1):3-15.
8. Przybyłek I, Karpinski TM. Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules*. 2019; 24(11): 1-17.
9. Kurek-Górecka A , Rzepecka-Stojko A , Górecki M, Stojko J , Sosada M, Świerczek-Zięba G. Structure and Antioxidant Activity of Polyphenols Derived from Propolis. *Molecules*. 2014; 19(1):78-101.
10. Kartal M, Yıldız S, Kayaa S, Kurucu S, Topçu G. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; 86: 69–73.
11. Premoli G, Laguado P, Díaz N, Romero C, Villarreal J, González A. Uso del propóleo en odontología. *Acta Odontológica Venezolana*. 2010;48 (2):1-13.

12. Mayta-Tovalino F, Sacsquispe-Contreras S, Ceccarelli-Calle J, Alania-Mallqui J. Propóleo Peruano: Una nueva alternativa terapéutica antimicrobiana en Estomatología. *Rev Estomatol Herediana*.2012; 22(1):50-58.
13. Oliveira R, Aires T. Resistência aos Antibacterianos. *Gazeta médica*. 2016;3 (2):14-21.
14. El-Guendouz S, Aazza S, Lyoussi B, Bankova V, Lourenço JP, Costa AM, et al. Impact of Biohybrid Magnetite Nanoparticles and Moroccan Propolis on Adherence of Methicillin Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 2016; 21(9): 1-18.
15. Wojtyczka R, Dziedzic A, Idzik D , Kępa M, Kubina R, Kabała-Dzik A , et al. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates to Propolis Extract Alone or in Combination with Antimicrobial Drugs. *Molecules*. 2013; 18(8): 9623–9640.
16. Pamplona-Zomenhan LC, Pamplona BC, da Silva CB, Marcucci MC, Mimica LM. Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of an ethanol extract of Brazilian classified propolis on strains of *Staphylococcus aureus*. *Braz J Microbiol*. 2011; 42(4):1259-1264.
17. Grecka K, Kus P, Okinczyc P, Worobo R, Walkusz J, Szveda P. The Anti-Staphylococcal Potential of Ethanolic Polish Propolis Extracts. 2019; 24 (9):2-24.
18. De Marco S, Piccioni M, Pagiotti R, Pietrella D. Antibiofilm and Antioxidant Activity of Propolis and Bud Poplar Resins versus *Pseudomonas aeruginosa*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017; 2017:1-11.
19. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7:1-29.
20. Devequi-Nunes D, Machado BAS, Barreto GA, Rebouças Silva J, da Silva DF, da Rocha JLC, et al. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PLoS One*. 2018; 13(12):1-20.

21. Suarez MA, Rosende RO, Finten de Tarallo SB. Propiedades del Propóleo y su relación con la salud y la práctica odontológica. Revista facultad de odontología.2013;7(1):21-26.
22. Morales JI, Landa M, García SG, Lavoignet M. Técnicas de recolección inteligente de productos apícolas aplicadas en colmenas de la región de Misantla. Revista Ingeniantes. 2019; 3 (2):3-7.
23. Instituto Argentino de Normalización. Norma IRAM-INTA 15935-2: Extractos de propoleos. Sub-comite de productos agroalimentarios del NOA. Buenos Aires; 2008.
24. Palomino G. Lady R. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. 2009 Agosto 15; 16(3): 388-395.
25. Galarza Álvarez Luis Rodrigo. Determinación del poder antibiótico in vitro del extracto etanólico del propóleo sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* presentes en metritis puerperal bovina. (Tesis previa a la obtención del título de magister en reproducción animal). Ecuador: Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Agropecuarias; 2013.
26. Huamán Oscar. Efecto del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de Bixa orellana (achiote), en la secreción gástrica de ratas. An Fac Med. Lima. 2007; 68(4): 314 – 320.
27. Fito M., P. Propiedades Coligativas de las Disoluciones. Termodinámica y Cinética de Sistemas alimento entorno. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia; 1998. p. 79-86.
28. Orrego Alzate, C. E. Congelación y Liofilización de Alimentos. Manizales: Universidad Nacional de Colombia; 2008.p. 49-72.
29. Barbosa, G., & Vega, H. Capítulo 7 Liofilización. Deshidratación de alimentos. Acribia S. A.; 2000. p. 203- 219.
30. Norma Salvadoreña. NSO 65.19.02:03 Calidad de propóleo crudo. [artículo de periódico en línea]. CONACYT – 2003.
31. Lock O, Cabello I, Doroteo V. Análisis de flavonoides en plantas. [artículo en línea]. Pontificia Universidad Católica del Perú – 2006.

32. Palomino, L., Martínez, J., García, C., Gil, J., Durango, D. Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana de propóleos en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*.2010;63(1): 5373-5383.
33. Ruiz J. Actividad Antifúngica In Vitro y Concentración Mínima Inhibitoria mediante Microdilución de ocho plantas medicinales [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2013.
34. Lee J-H. Comparative Analysis of Chemical Compositions and Antimicrobial Activities of Essential Oils from *Abies holophylla* and *Abies koreana*. *J Microbiol Biotechnol*. 2009;19(4):372–7.
35. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility. Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition. Vol. 32, CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
36. Liu M, et al. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods*. 2007;42(4):325–9.
37. Wiegand I, Hilpert K, Hancock R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 2008;3(2):163–75.
38. Paredes P, et al. Screening of Bioactivities and Toxicity of *Cnidioscolus quercifolius* Pohl. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2016;2016.
39. Holetz F, et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. 2002;97(7):1027–31.
40. Cullen, M., Atomic Spectroscopy in Elemental Analysis, CRC Press, 2004, pp. 228-237, 251.
41. Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., Principles of Instrumental Analysis, Saunders College Publishing, 5th Ed., 1998, pp. 214-220.
42. Welz B., Becker-Ross H., Florek S., Heitmann U., High Resolution Continuum Source AAS. Wiley-VCH.2005;53-61.
43. Ebdon L, Evans E.H., Fisher A, Hill S. An Introduction to Analytical Atomic Spectrometry. John Wiley and Sons. 1998; 17-23.

44. The PerkinElmer Inc. Standard Atomic Absorption Conditions for K. Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy. United States of America.1996; 83.
45. USP 41 - NF 36. Capítulos Generales. <1852> Espectroscopía de absorción atómica-teoría y práctica. 2018 Mayo; p.8725-8734.
46. Soto M. Metabolitos secundarios, cuantificación de fenoles y flavonoides totales de extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú. Revista in crescendo institucional. 2015 Noviembre; 6(2): 22-32.
47. Rodríguez B, Penieres JG, Canales MM, Cruz TA. Actividad antibacteriana de propóleos con la adición de chalconas sintéticas. Acta Universitaria.2020;30:1-15.
48. Fonte L, Milián Y, Díaz M. Potencialidad antimicrobiana y caracterización de propóleos de *Melipona beecheii* provenientes de dos fincas agroindustriales. Estación experimental de pastos y forrajes “Indio hatuey”.2016; 39(2):149-156
49. T.P. Tim Cushnie. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. Journal of Ethnopharmacology.2005;101: 243–248.

9. ANEXOS

Anexo 1. Tratamiento de muestras



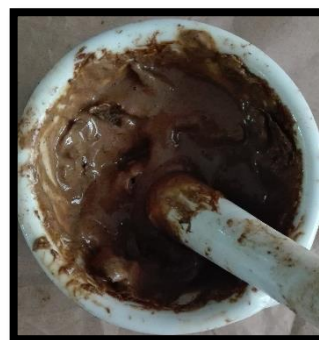
1. Toma de muestra por método de raspado en las superficies de las tapas de la colmena.



2. Selección de las muestras para eliminar impurezas visibles



3. Pesado de la cantidad de propóleo obtenida libre de impurezas



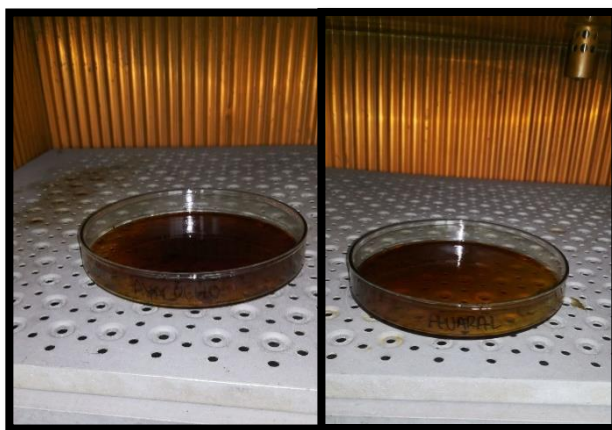
4. Disminución del tamaño de partícula de las muestras para facilitar la maceración.



5. Preparación de los extractos etanólicos de propóleo (EEP) al 30% en frasco de vidrio color ámbar (Maceración por 15 días)



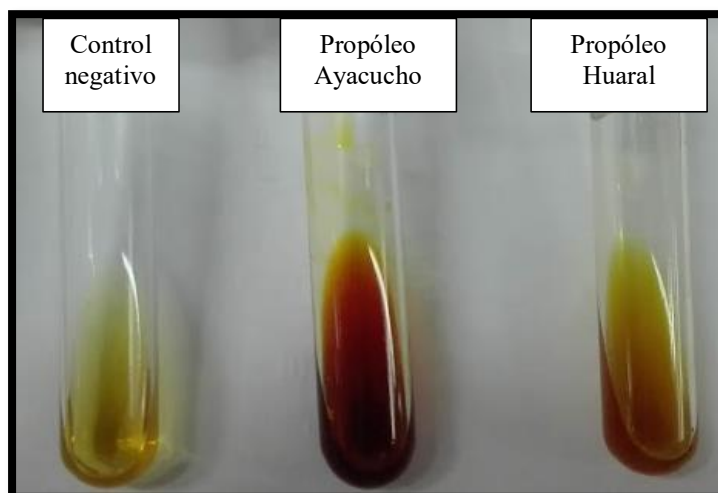
6. Filtrado de muestras



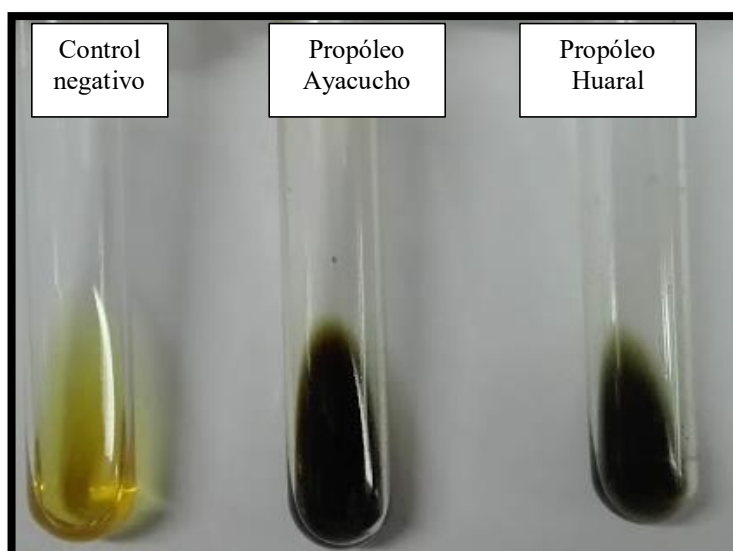
7. Desecado de muestras filtradas en estufa a 40°C (Previo al proceso de liofilización)

Anexo 2. Análisis cualitativo para determinación de compuestos fenólicos

Reacción con hidróxido de sodio

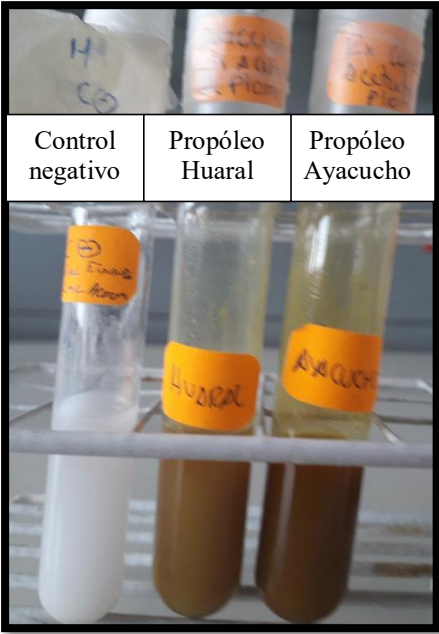


Reacción con cloruro férrico

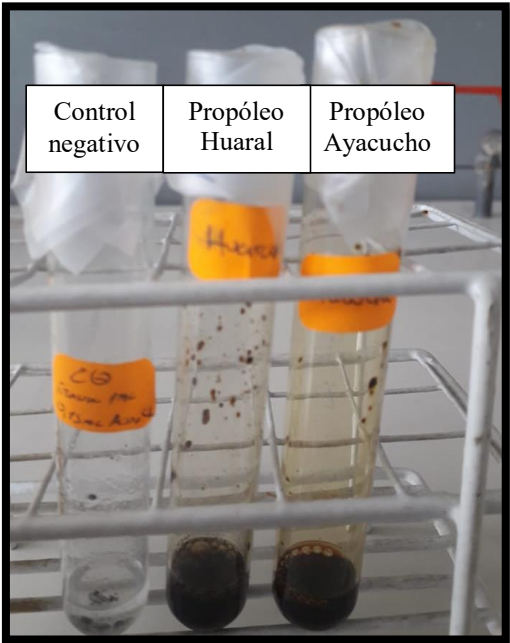


Anexo 3. Análisis cualitativo para determinación de flavonoides totales

Reacción con acetato de plomo

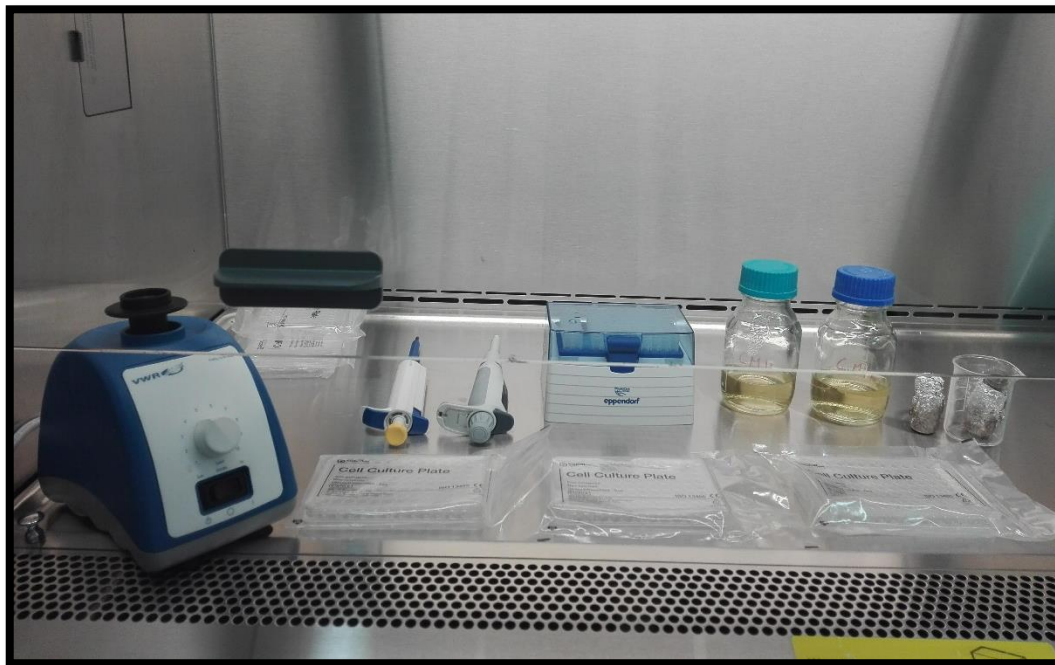


Reacción de Shinoda

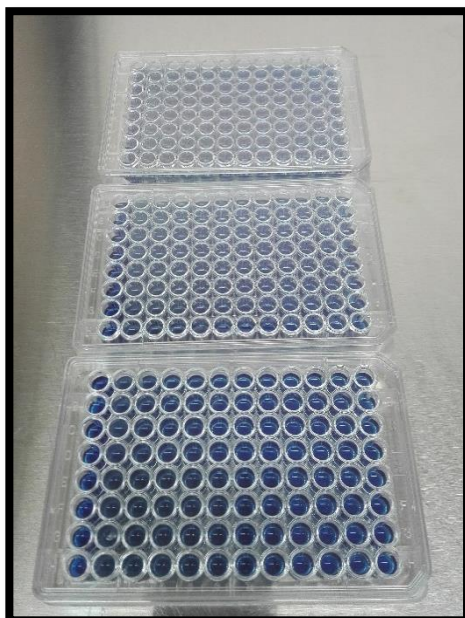


Anexo 4. Ensayo de microdilución colorimétrica

Materiales a emplear en el método de microdilución colorimétrica

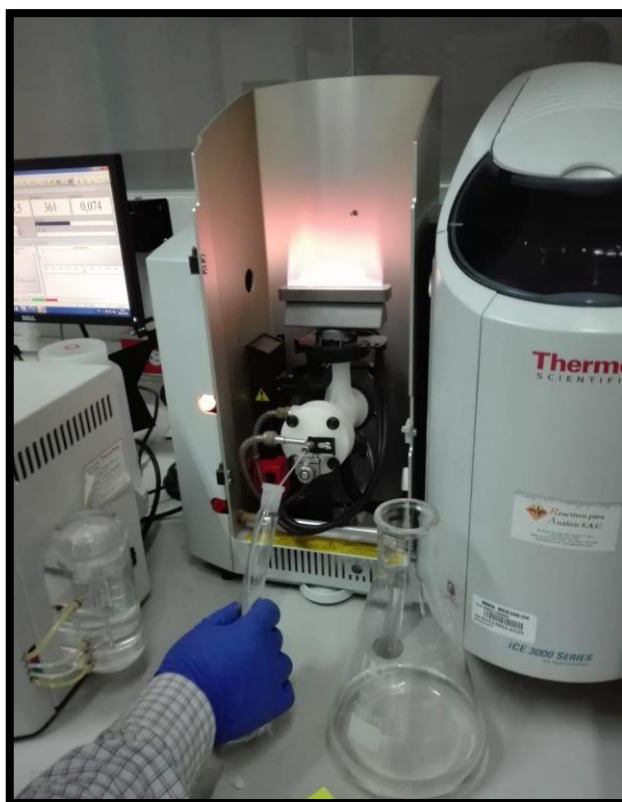


Placas en forma de “U”

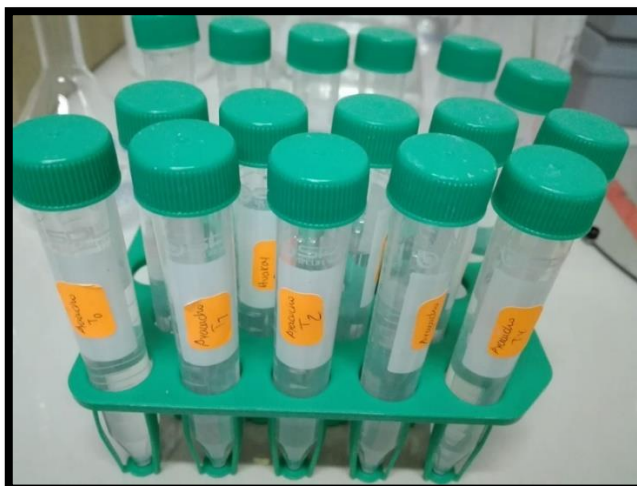


Anexo 5. Espectrometría de absorción atómica a la llama

Lectura de muestras y estándares en espectrómetro de absorción atómica a la llama marca Thermo Scientific Ice 3000 Series



Muestras listas para analizar en espectrómetro de absorción atómica a la llama



Anexo 6. Lista de materiales y reactivos

Material biológico

- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Medios de cultivo

- ✓ Agar Manitol Salado
- ✓ Agar Cetrimide
- ✓ Agar Mueller Hinton

Equipos

- ✓ Autoclave – FAVRILL
- ✓ Estufa – MEMMERT
- ✓ Balanza Analítica – Denver Modelo XP-300
- ✓ Vortex – FISHER Mini Shaker
- ✓ Espectrofotómetro UV Visible
- ✓ Sonicador
- ✓ Espectrómetro de absorción atómica a la llama marca Thermo Scientific Ice 3000 Series
- ✓ Equipo de liofilizado

Reactivos

- ✓ Solución salina fisiológica (0,9%)
- ✓ Alcohol etílico 96° (grado reactivo)
- ✓ Hidróxido de sodio en lentejas
- ✓ Cloruro Férrico
- ✓ Acetato de plomo

- ✓ Granallas de magnesio metálico
- ✓ Ácido clorhídrico concentrado
- ✓ Quercetina
- ✓ Acetato de sodio
- ✓ Nitrato de aluminio
- ✓ Ácido gálico
- ✓ Reactivo Folin-Ciocalteu
- ✓ Carbonato de sodio
- ✓ Resazurina
- ✓ Suero albumina de bovino
- ✓ Agua destilada
- ✓ Cloruro de cesio
- ✓ Ácido clorhídrico
- ✓ Dimetilsulfóxido (DMSO)
- ✓ Solución madre stock de potasio 1000 ppm

Otros materiales

- ✓ Micropipeta Transferpette de 100 – 1000 μ L – BRAND
- ✓ Placas petri de vidrio de 90 mm de diámetro
- ✓ Frascos Schott de 250 y 500 mL
- ✓ Microplacas de 96 pocillos estériles con fondo en U
- ✓ Recipiente de polipropileno
- ✓ Material de laboratorio diverso.